

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS VINAGRES BRASILEIROS

MÁRCIA ZILIOI BELLINI
Biólogo

Prof^ª Dr^ª. GABRIELA ALVES MACEDO
Orientador

Dr^ª WILMA SPINOSA
Co-Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, para obtenção
do Título de Mestre em Ciência de Alimentos

Campinas
2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

B417c Bellini, Márcia Zilioli
Caracterização bioquímica dos vinagres brasileiros /
Márcia Zilioli Bellini. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Gabriela Alves Macedo
Co-orientador: Wilma Spinosa
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Vinagre - Composição. 2. Ácidos orgânicos. 3.
Fenóis totais. 4. Atividade antioxidante. I. Macedo,
Gabriela Alves. II. Spinosa, Wilma. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. IV. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Brazilian vinegars biochemical characterization

Palavras-chave em inglês (Keywords): Vinegar - Composition, Organic acids, Total
phenolics, Antioxidant activity

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Gabriela Alves Macedo
Gláucia Maria Pastore
Regina Prado Zanes Furlani
João Ernesto de Carvalho

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Gabriela Alves Macedo
FEA/UNICAMP
Orientador

Prof^a Dr^a Gláucia Maria Pastore
FEA/UNICAMP

Dr João Ernesto de Carvalho
CPQBA

Dr^a Regina Prado Zanes Furlani
ITAL

DEDICATÓRIA

Para Lays, Pedro
e Rogério

Ao meu querido irmão Estêvão, pela sua colaboração e disposição durante todo o desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus pais, Ruberval e Maria Eugênia, formadores do meu DNA, cujos genes procuro honrar;

Às minhas irmãs, Eugênia, Luciana e Daniela, pelo apoio e estadia durante todo o tempo;

Aos meus sobrinhos Marina e Daniel.

AGRADECIMENTOS

À Empresa Vinagre Saboroso, na pessoa de Ricardo Llorca, pela doação de amostras e pela atenção;

À Usina Nova América, por permitir o uso de seus laboratórios e equipamentos; agradeço especialmente à Eng. Elaine por sua dedicação fora do comum;

À Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA, pela colaboração durante todo o desenvolvimento deste trabalho;

Às professoras Gabriela Alves Macedo e Wilma Spinosa, pela orientação, amizade e compreensão;

Aos colegas do Colégio FEMA pelo incentivo;

Aos colegas do SESI – CE 280 Assis, em especial às “meninas” do noturno: Sonia, Marlene, Vera, Silvia e Flávia, e à coordenadora Edna, que tanto me apoiaram nesta jornada;

Aos meus sogros Gilberto e Ana, pela colaboração sem medida, na ajuda com as crianças.

À minha querida cunhada Gláucia que não mediu esforços para ajudar;

Aos meus cunhados Saulo, Sérgio e Cleber, sempre prontos, a qualquer momento;

À Rute, companheira da casa, que sem seu apoio não seria possível minha dedicação aos estudos.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS DO ANEXO	xii
RESUMO	xiv
SUMMARY	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Vinagre	4
2.1.1 O gênero <i>Acetobacter</i>	6
2.2 Produção e processo	8
2.3 Composição físico-química	13
2.3.1 Ácidos orgânicos	15
2.4 Compostos Antioxidantes	18
2.4.1 Espécies reativas de oxigênio	18
2.4.2 Compostos fenólicos	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Material	27
3.1.1 Amostras	27
3.1.2 Equipamentos	27
3.1.3 Reagentes	27
3.2 Metodologia	29
3.2.1 Quantificação e determinação de ácidos orgânicos	29
3.2.2 Determinação dos compostos fenólicos totais	30
3.2.3 Determinação da atividade antioxidante	30
3.2.4 Determinação da atividade sequestrante de radicais livres	31
3.2.5 Vinagre de álcool envelhecido em madeira	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Determinação de ácidos orgânicos	33
4.2 Determinação de compostos fenólicos totais	36
4.3 Determinação da atividade antioxidante	40

4.4	Determinação da atividade de seqüestro de radicais livres	44
4.5	Vinagre de álcool envelhecido em madeira	56
5	CONCLUSÕES	60
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
7	ANEXO	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Via metabólica da assimilação oxidativa do etanol pelos ciclos dos ácidos tricarboxílicos e do glioxilato.....	7
Figura 2	Esquema de produção do vinagre.....	9
Figura 3	Etapas de um elétron na redução do oxigênio, levando à formação das espécies reativas de oxigênio superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila.....	19
Figura 4	As reações de Fenton e Haber-Weiss para formação do radical hidroxila tóxico.....	20
Figura 5	Explosão respiratória em fagócitos.....	21
Figura 6	Atividade antioxidante das amostras de vinagre em estudo.....	42
Figura 7	Fenóis totais e índice de antioxição em amostras de vinagres de vinho tinto e branco.....	43
Figura 8	Análise de seqüestro de radical DPPH em vinagre de vinho tinto da marca 2.....	47
Figura 9	Análises de seqüestro de radical DPPH em vinagres de vinho tinto.....	47
Figura 10	Análise de seqüestro de radical DPPH em vinagre de vinho branco da marca 1.....	48
Figura 11	Análises de seqüestro de radical DPPH em vinagres de vinho branco.....	48
Figura 12	Análise de seqüestro de radical DPPH em <i>Agrin</i> tinto da marca 2.....	49
Figura 13	Análises de seqüestro de radical DPPH em <i>Agrins</i> tintos.....	49
Figura 14	Análise de seqüestro de radical DPPH em <i>Agrin</i> branco da marca 1.....	50
Figura 15	Análises de seqüestro de radical DPPH em <i>Agrins</i> brancos.....	50

Figura 16	Análise de seqüestro de radical DPPH em vinagre de álcool da marca 1.....	51
Figura 17	Análises de seqüestro de radical DPPH em vinagres de álcool.....	51
Figura 18	Análise de seqüestro de radical DPPH em vinagre de maçã da marca 1.....	52
Figura 19	Análises de seqüestro de radical DPPH em vinagres de maçã.....	52
Figura 20	Análise de seqüestro de radical DPPH em vinagre de arroz da marca 5.....	53
Figura 21	Análises de seqüestro de radical DPPH em vinagres de arroz.....	53
Figura 22	Análise de seqüestro de radical DPPH em vinagre de laranja da marca 2.....	54
Figura 23	Análises de seqüestro de radical DPPH em vinagre de laranja da marca 2.....	54
Figura 24	Resultados de índice de fenóis totais e seqüestro de radicais DPPH dos vinagres estudados.....	55
Figura 25	Resultados das análises de fenóis totais, índice antioxidante e seqüestro de radical DPPH em vinagres de álcool envelhecidos com madeira.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Produção de vinagre na União Européia.....	13
Tabela 2	Categorias de vinagres analisados e seu código de identificação.....	28
Tabela 3	Concentrações (ppm) dos ácidos aconítico, cítrico, tartárico, málico, succínico, láctico, acético e butírico das amostras de vinagre estudadas.....	33
Tabela 4	Índice de fenóis totais das amostras de vinagres analisadas.....	36
Tabela 5	Índice de antioxição	40
Tabela 6	Resultados de fenóis totais e índice de antioxição em amostras de vinagres de vinho tinto e branco	43
Tabela 7	Resultados das análises de seqüestro de radicais livres das amostras de vinagre com base na atividade seqüestrante do ácido gálico.....	45
Tabela 8	Resultados do índice de fenóis totais, índice de antioxição e atividade seqüestrante de DPPH e concentração de ácido acético em amostras de vinagre de álcool envelhecidas em madeira Carvalho (Q. rubra), Cabriúva (M.frondous) e sem aparas por um período de 30 dias.....	57

LISTA DE FIGURAS DO ANEXO

Figura A1	Atividade de Seqüestro de Radicais DPPH dos antioxidantes Ácido Ascórbico, Ácido Gálico, α -Tocoferol e Cisteína.....	71
Figura A2	Quantificação cromatográfica dos ácidos orgânicos do vinagre Balsâmico da empresa 1.....	72
Figura A3	Quantificação cromatográfica dos ácidos orgânicos do vinagre de vinho tinto da empresa 1.....	72
Figura A4	Quantificação cromatográfica dos ácidos orgânicos do vinagre de vinho tinto da empresa 2.....	73
Figura A5	Quantificação cromatográfica dos ácidos orgânicos do vinagre de vinho tinto da empresa 3.....	73
Figura A6	Quantificação cromatográfica dos ácidos orgânicos do vinagre de vinho branco da empresa 1.....	74
Figura A7	Quantificação cromatográfica dos ácidos orgânicos do vinagre de vinho branco da empresa 3.....	74
Figura A8	Quantificação cromatográfica dos ácidos orgânicos do <i>Agrin</i> branco da empresa 1.....	75
Figura A9	Quantificação cromatográfica dos ácidos orgânicos do <i>Agrin</i> branco da empresa 2.....	75
Figura A10	Quantificação cromatográfica dos ácidos orgânicos do <i>Agrin</i> branco da empresa 3.....	76
Figura A11	Quantificação cromatográfica dos ácidos orgânicos do <i>Agrin</i> tinto da empresa 1.....	76
Figura A12	Quantificação cromatográfica dos ácidos orgânicos do <i>Agrin</i> tinto da empresa 2.....	77
Figura A13	Quantificação cromatográfica dos ácidos orgânicos do <i>Agrin</i> tinto da empresa 3.....	77
Figura A14	Quantificação cromatográfica dos ácidos orgânicos do Vinagre de álcool da empresa 1.....	78

Figura A15	Quantificação cromatográfica dos ácidos orgânicos do Vinagre de álcool da empresa 3.....	78
Figura A16	Quantificação cromatográfica dos ácidos orgânicos do Vinagre de maçã da empresa 1.....	79
Figura A17	Quantificação cromatográfica dos ácidos orgânicos do Vinagre de maçã da empresa 2.....	79
Figura A18	Quantificação cromatográfica dos ácidos orgânicos do Vinagre de maçã da empresa 3.....	80
Figura A19	Quantificação cromatográfica dos ácidos orgânicos do Vinagre de arroz da empresa 1.....	80
Figura A20	Quantificação cromatográfica dos ácidos orgânicos do Vinagre de arroz da empresa 3.....	81
Figura A21	Quantificação cromatográfica dos ácidos orgânicos do Vinagre de arroz da empresa 4.....	81
Figura A22	Quantificação cromatográfica dos ácidos orgânicos do Vinagre de arroz da empresa 5.....	82
Figura A23	Quantificação cromatográfica dos ácidos orgânicos do Vinagre de arroz da empresa 6.....	82

RESUMO

O Vinagre, alimento consumido em grande parte do mundo, pode ser produzido a partir de diferentes matérias-primas, desde que o substrato apresente fontes de carboidratos fermentescíveis e alguns micro-nutrientes como vitaminas do complexo B e minerais.

As alusões sobre os efeitos medicamentosos do vinagre são inúmeras e pouco comprovadas cientificamente. A literatura sobre o assunto concentra-se basicamente, na Ásia e parte da Europa, principalmente na região do Mediterrâneo onde é muito consumido.

Os efeitos benéficos à saúde do consumo moderado de vinho têm sido amplamente estudados nos últimos anos. Estes, têm sido atribuídos principalmente ao conteúdo de polifenóis e da atividade antioxidante deste compostos (Alonso *et al.*, 2004). Produtos derivados do vinho, dentre eles o vinagre, também contém polifenóis e podem possuir uma certa atividade antioxidante, contribuindo igualmente para um efeito protetor do organismo.

Além da presença de compostos polifenólicos, o vinagre apresenta uma série de ácidos orgânicos, sendo o principal o ácido acético. Estudos comprovam o efeito bactericida e bacteriostático desses ácidos (Silva et al, 2001), bem como uma elevada atividade antimutagênica (Lankaputra, 1998).

O vinagre é um produto de fácil acesso no Brasil, porém pouco valorizado comercialmente devido, em parte, ao desconhecimento do consumidor de suas propriedades funcionais. Isto é um reflexo do pequeno número de pesquisas realizadas no país sobre este tema. Estudos realizados na Europa e Ásia comprovam o grande número de compostos funcionais presentes nos vinagres produzidos nestas regiões, aumentando ainda mais sua importância na dieta local.

Apesar do número razoável de estudos sobre vinagre no exterior, a maioria dos dados obtidos nestas pesquisas não pode ser atribuída aos vinagres nacionais, por estarem diretamente relacionados à matéria prima utilizada.

Este projeto analisou a atividade antioxidante, conteúdo de fenóis totais, perfil de ácidos orgânicos e seqüestro de radical DPPH de vinagres brasileiros.

O perfil de ácidos orgânicos nas amostras analisadas evidenciou a relação direta entre a presença desses ácidos com a matéria-prima fermentada, podendo ser um importante controle na qualidade do produto industrializado. As análises sugeriram que o conteúdo de fenóis totais influi nas propriedades antioxidantes e de seqüestro de radicais livres dos vinagres. Isto é provado nos experimentos usando vinagre de álcool envelhecidos em madeira.

SUMMARY

Vinegar, which can be made from starch or prepared from fermentable raw material, is a widely consumed acid seasoning and contains vitamins, minerals and other nutrients.

There is historical evidence from vinegar medicinal uses due to such physiological functions as digestive, appetite stimulating, exhaustion recovering effects, improve blood fluidity and antimicrobial effects.

Since vinegar presents a low consumption per capita and no nutritional effects recognized in Brazil, there is an interest in studying this product in order to improve and standardize the production in Brazil.

This project was interested in antioxidant activity, total phenolic content, organic acids profile and DPPH radical scavenging properties from Brazilian vinegars.

The organic acid profile from each sample was determined and can be an important control quality tool to related industries. The analysis suggests that the total phenolic content affects the antioxidative and radical scavenging properties from vinegars. This is proved in the experiment using wood lice to conserve and age ethanol vinegar.

1 INTRODUÇÃO

O Vinagre, alimento consumido em grande parte do mundo, pode ser produzido a partir de diferentes matérias-primas, desde que o substrato apresente fontes de carboidratos fermentescíveis e alguns micro-nutrientes como vitaminas do complexo B e minerais (ADAMS, 1998).

A produção do vinagre pode ocorrer como fermentação espontânea, pois os dois microrganismos necessários para sua produção estão associados a vegetais, fazendo parte de sua microbiota natural. Além disto, cada estágio apresenta condições processuais que, de certo modo, restringem a competição microbiana. Inicialmente, concentrações elevadas de açúcares favorecem a produção de etanol pela levedura. Durante a fermentação alcoólica, condições anaeróbias são criadas, o pH diminui e a concentração de etanol se eleva. No final da fermentação alcoólica, quando os açúcares são consumidos, condições aeróbias são restabelecidas, permitindo a ação de bactérias acéticas que converterão etanol em ácido acético, diminuindo ainda mais o pH dando origem ao vinagre (ADAMS, 1998).

Além de conservante, o vinagre é um condimento extremamente apreciado sendo utilizado na culinária de vários países, desde a antiguidade. Existem muitas informações sobre o preparo do vinagre na Roma antiga, bem como seu uso como condimento e conservante, além de sua utilização na medicina. Plinius recomendava tomar vinagre para o tratamento de náusea, soluço, lepra, sardas, úlceras, mordida de cão, ferroadas de escorpião e picadas de insetos venenosos (SWINGS, 1992).

As alusões sobre os efeitos medicamentosos do vinagre são inúmeras e pouco comprovadas cientificamente. A literatura sobre o assunto concentra-se basicamente, na Ásia e parte da Europa, principalmente na região do Mediterrâneo onde é muito consumido.

A literatura internacional cita que o vinagre apresenta uso medicamentoso em virtude de seus efeitos fisiológicos, auxilia na digestão, estimula o apetite e promove a recuperação da exaustão física. O vinagre de arroz integral (Kurosu), muito consumido no

Japão, é apontado como algo que previne a hipertensão e melhora a circulação sanguínea. A comprovação desses efeitos, segundo Shimiji *et al.* (2002), daria ao vinagre o ‘status’ de alimento funcional, que por seu conteúdo químico e outras propriedades exercem atividade terapêutica e por isso são empregados na prevenção e no tratamento de diversas doenças no Japão (SHIMOJI *et al.*, 2002).

A ampla escala de valores obtidos pelos parâmetros físico-químicos e sensoriais, é um dos principais problemas na caracterização do vinagre. O processo de produção, tipo de matéria prima e método de envelhecimento, são os principais fatores da variação entre os vinagres.

O vinagre é um produto de fácil acesso no Brasil, porém pouco valorizado comercialmente devido, em parte, ao desconhecimento do consumidor de suas propriedades funcionais. Isto é um reflexo do pequeno número de pesquisas realizadas no país sobre este tema. Estudos realizados na Europa e Ásia comprovam o grande número de compostos funcionais presentes nos vinagres produzidos nestas regiões, aumentando ainda mais sua importância na dieta local.

Um número reduzido de estudos sobre vinagre está publicado na literatura científica mundial. A maioria deles foi realizada na Europa ou Japão. Pouquíssimos trabalhos tratam do vinagre sob o ponto de vista nutricional, mas alguns já lançam luz sobre este aspecto deste antigo alimento. A motivação principal deste estudo foi conhecer os vinagres produzidos no Brasil com diferentes matérias primas, caracterizando sua composição e potencial nutricional.

Caracterizando alguns vinagres brasileiros quanto à presença de compostos bioativos, este trabalho espera contribuir com dados que forneçam subsídios para novos estudos, incentivando a valorização do produto brasileiro.

Em suma, os objetivos gerais e específicos do trabalho são os seguintes:

- Analisar amostras de vinagres de diversas fontes, produzidos no Brasil, quanto à presença e ação de moléculas bioativas com atividade antioxidante.
- Analisar e comparar a influência do tipo de madeira no processo de envelhecimento e na agregação de compostos antioxidantes ao vinagre de álcool.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Vinagre

A descoberta do vinagre pelo homem se deu quase que simultaneamente às bebidas alcoólicas fermentadas, devido à próxima relação entre a produção de etanol e de vinagre (ADAMS, 1998).

Na antiga China, o vinagre era símbolo da vida. Há 5 mil anos, os egípcios, babilônios, indianos, gregos e persas conheciam a arte da fabricação e versatilidade do vinagre: além de tempero, era o único meio para conservação de carnes, peixes, legumes e muito apreciado por seu efeito refrescante. Existem relatos que os legionários romanos, soldados, agricultores e viajantes, até na Idade Média, bebiam água com vinagre para matar a sede e para a saúde (SWINGS, 1992).

Cada tipo de vinagre tem seu sabor, pois na transformação do álcool em ácido acético preservam-se valiosas substâncias aromáticas das matérias-primas originais e outros ácidos orgânicos podem ser formados (SPINOSA, 2002).

Ao ser utilizado como alimento, o vinagre de frutas é mais nutritivo por conter mais substâncias assimiláveis pelo organismo, como vitaminas, ácidos orgânicos e mesmo proteínas e aminoácidos, originários do fruto e da fermentação alcoólica de que proveio. Além disso, os vinhos de fruta dão origem a vinagres mais suaves e menos agressivos ao paladar por ter seu pH atenuado pelas substâncias orgânicas presentes. O álcool etílico apresenta vantagens econômicas pois é uma matéria prima cerca de seis vezes mais barata, se comparada ao vinho de uvas, o que incentiva a substituição do vinho de uvas por álcool de cana para a produção de vinagre, principalmente em regiões tropicais ou subtropicais com indústria alcooleira ou açucareira muito desenvolvida e com baixa produção de vinho de uvas (AQUARONE & ZANCANARO, 1990).

Como condimento, o vinagre é usado em certos alimentos apenas com a finalidade de conferir sabor ácido ao produto, como nas saladas e maioneses. Em outros alimentos, além de conferir sabor e odor, o vinagre atua como conservante e agente de amaciamento do produto, como acontece nas carnes temperadas e legumes em conserva (ADAMS, 1998).

Nos últimos anos a importância do vinagre como produto alimentício tem crescido (NATERA *et al.*, 2003). De acordo com *Vinegar Institute Production Survey* (1989) 16,8% do vinagre produzido nos EUA é destinado para molhos, 14,8% em pickles, 11,5% em mostardas, 10,5% em conservas, 8,5% em produtos à base de tomate e 33,7% é vendido engarrafado (ACNielsen, 2005).

As propriedades preservativas do vinagre são utilizadas, principalmente contra fungos em pães, panetones e biscoitos, embora se saiba que as bactérias lácticas também sejam sensíveis ao ácido acético. Como agente de limpeza, o vinagre é empregado em materiais metálicos (prata, alumínio, latão) com a finalidade de clareá-los, através de reação de oxido-redução. (AQUARONE & ZANCANARO, 1990).

Por outro lado, sendo uma solução ácida relativamente forte, praticamente disponível em todos os lares, o vinagre é utilizado ainda para muitas outras finalidades: antisséptica em ferimentos e doenças da pele (varicose e micose); preparação de soluções medicamentosas (vinagre canforado para dores musculares, contusões e distensões, solução para gargarejos em casos de infecções da boca e garganta); e é usado ainda como solução espermicida, germicida, inseticida e solvente (AQUARONE & ZANCANARO, 1990).

OGAWA *et al* (2000) sugerem que o nível de glicose sanguíneo pode ser abaixado pela administração oral de vinagre. Em seu estudo com culturas de células expostas a soluções de ácido acético, observaram uma inibição na atividade das enzimas dissacarídeses – sacarase, maltase, trealase e lactase – responsáveis pela conversão de dissacarídeos em monossacarídeos. Soluções de outros ácidos orgânicos, como cítrico, succínico, láctico e tartárico não apresentaram esse efeito inibidor.

NISHIDAI *et al.* (2000) estudaram atividade antitumoral do vinagre de arroz integral em tecido de rato e sugerem o uso deste produto no retardo do desenvolvimento de tumores pela inibição do estresse oxidativo, um importante mecanismo para a estimulação tumoral.

2.1.1 O gênero *Acetobacter*:

Representantes de bactérias acéticas pertencentes ao gênero *Acetobacter* foram usados desde os primórdios para a produção do vinagre por fermentação (BILSKA *et al.*, 2003).

As bactérias do gênero *Acetobacter* são células elipsoidais em forma de bastonetes, retos ou ligeiramente curvos, com dimensões de 0,6-0,8 µm por 1,0-4,0 µm, ocorrendo isoladas, em pares ou em cadeias. Formas involutivas em algumas linhagens são freqüentes, podendo ser espirais, alongadas, dilatadas, associadas, curvadas ou filamentosas. As que apresentam motilidade possuem flagelos peritríquios ou laterais e outras são não-móveis. Não formam endosporos, de modo geral são Gram negativas, com poucos casos de Gram variáveis. O metabolismo dessas bactérias é respiratório, nunca fermentativo, portanto, são obrigatoriamente aeróbias. A temperatura ótima de crescimento está na faixa de 25-30°C e o pH ótimo de crescimento situa-se entre 5,4-6,3 (DE LEY *et al.*, 1984).

Ocorrência da *Acetobacter* se dá em flores, frutas, mel, saquê, tequila, vinho de palma, grapa, cidra, cerveja, kefir, cerveja Bantu sul-africana, leveduras fermentadas, vinagre, aparas de madeira usadas em acetador de produção de vinagre pelo processo rápido, acetificadores de vinagre, caldo de cana, solo de jardins e canal de água. *Acetobacter* causam doença rosa em abacaxi e podridão em maçãs e pêras. A bactéria acética é usada na fabricação de vinagre e é deteriorante em cervejas e vinhos (DE LEY *et al.*, 1984; HOLT *et al.*, 1994; SWINGS, 1992 *apud* SPINOSA 2002).

O etanol é oxidado por duas reações seqüenciais, catalisadas por enzimas ligadas à membrana bacteriana: a álcool desidrogenase (ADH) e a aldeído desidrogenase (ALDH).

Essas reações de oxidação são chamadas “fermentação oxidativa”, uma vez que envolvem oxidação incompleta do etanol, acompanhada pelo acúmulo do produto de oxidação correspondente, em grande quantidade no meio de crescimento (EBNER *et al.* 1996 *apud* SPINOSA, 2002).

Recentemente, outro grupo de enzimas ADH e ALDH foram encontradas no citoplasma de *Acetobacter*, sendo chamadas de ADH e ALDH dependentes de NAD(P). Essas enzimas parecem estar mais envolvidas com a assimilação do etanol no ciclos dos ácidos tricarboxílicos e do glioxilato, sendo as enzimas da membrana – independentes da NAD(P) – as responsáveis pela produção de ácido acético. A Figura 01 ilustra a ação desses dois grupos de enzimas (CHINNAWIROTPISAN *et. al.*, 2003) .

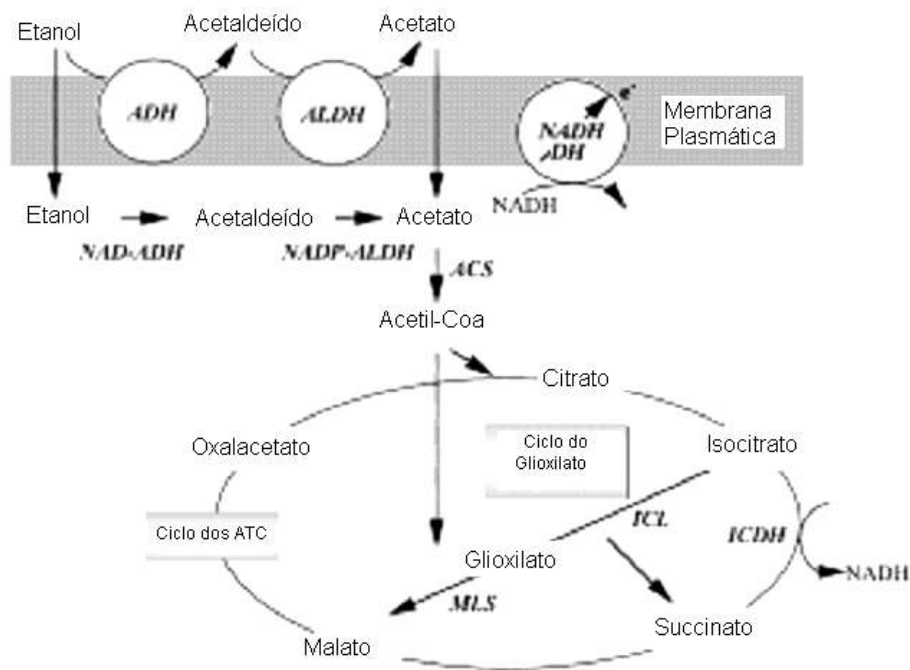
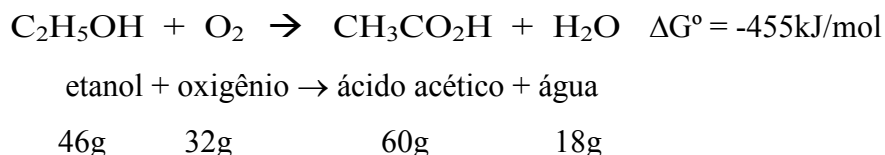


Figura 1. Via metabólica da assimilação oxidativa do etanol pelos ciclos dos ácidos tricarboxílicos e do glioxilato. (As enzimas envolvidas na assimilação estão abreviadas na figura. NAD-ADH, Álcool Desidrogenase dependente do NAD; NADP-ALDH, Acetaldeído Desidrogenase dependente de NADP; ACS, Acetil-CoA sintetase; ICL, isocitrato liase; MLS, malato sintetase; e ICDH, isocitrato desidrogenase (Adaptado de CHINNAWIROTPISAN *et. al.*, 2003))

Para hidrolisar açúcares a *Acetobacter* faz a rota metabólica da hexose monofosfato e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos. A glicólise está ausente ou fracamente executada, assim como a fosfofrutoquinase também está ausente. O ciclo de Entner-Doudoroff parece ocorrer somente nas linhagens de *Acetobacter* que sintetizam celulose, formalmente classificadas como *A. aceti* subsp. *xylinum*. Nestas, o citado ciclo é mais ativo do que o ciclo da hexose monofosfato. Linhagens capazes de crescer em meio Hoyer com etanol como única fonte de carbono e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como única fonte de nitrogênio utilizam enzimas da rota secundária do glicoxilato. *Acetobacter*, assim como *Gluconobacter*, têm notável capacidade oxidativa de açúcares, álcoois e esteróides (ASAI, 1968; DE LEY *et al.*, 1984).

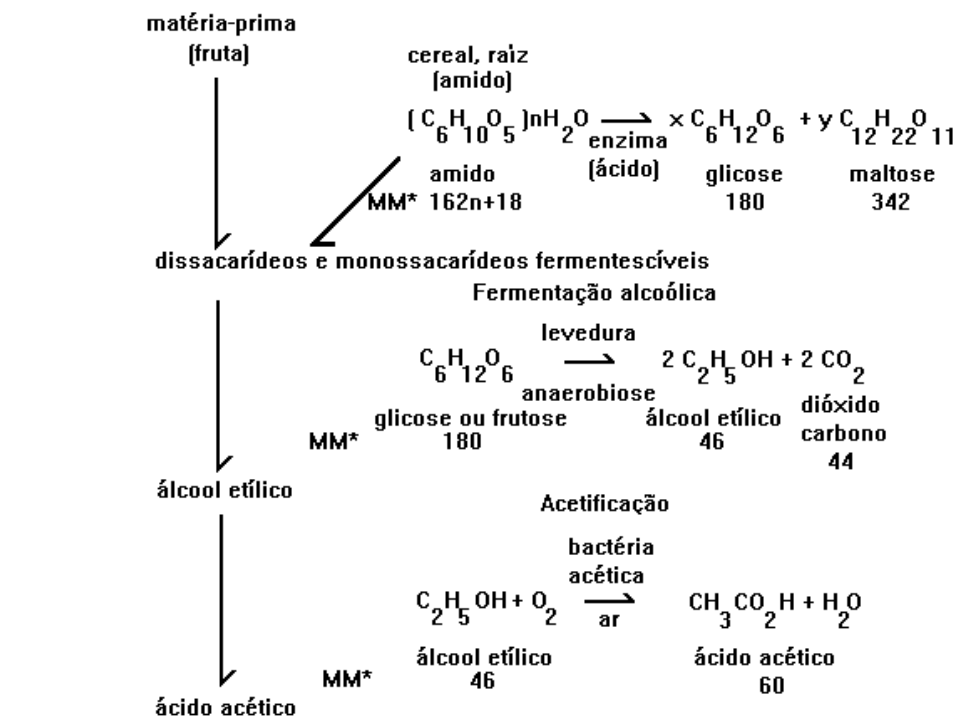
O processo de acetificação é caracterizado pelo consumo de O_2 , ocorrendo a liberação de grandes quantidades de energia. A oxidação segue de acordo com a equação básica:



A oxidação do etanol formando ácido acético é uma reação exotérmica que necessita de oxigênio e produz 117kcal/mol de etanol oxidado e 0,56 kg de ácido acético por m^3 de ar (SPINOSA, 2002).

2.2 Produção e processo

O vinagre é produzido em dois estágios de fermentação. No primeiro estágio, açúcares fermentescíveis são convertidos a etanol pela ação de leveduras, normalmente *Saccharomyces cerevisiae*. No segundo estágio, bactérias dos gêneros *Acetobacter* ou *Gluconobacter* convertem o etanol em ácido acético. A figura 02 mostra o esquema de produção do vinagre.



* Massa Molar

Conversão estequiométrica: 1g de glicose \rightarrow 0,51g de álcool etílico \rightarrow 0,67g de ácido acético

Figura 2. Esquema de produção do vinagre (ADAMS, 1998)

Processos de Produção

Existem três principais processos de conversão microbiológica de uma solução diluída de etanol em vinagre: o processo lento ou orleans, o processo rápido ou alemão e o processo submerso.

O processo lento, orleans ou francês é o processo mais antigo, observado a partir do avinagramento do vinho colocado em barricas semi-cheias. O vinagre, produzido por este método, tem qualidade considerada superior à do obtido por outros meios, isto porque ocorre o amadurecimento natural no vinagre, antes de sua retirada. Esse amadurecimento reduz o sabor picante, próprio dos vinagres recém produzidos, tornando o líquido mais suave e, conseqüentemente, mais agradável (ZANCANARO, 1988; SPINOSA, 1996).

O processo rápido ou alemão, também chamado de *Schützenback*, *Boerhave*, surgiu na Alemanha, no início do século XIX, tornando-se até meados do século XX o principal

processo para a produção industrial de vinagre. Originou-se a partir da observação da importância da aeração no processo lento. O sistema de produção por meio de gerador é talvez o mais comum, em se falando do processo rápido. O gerador, sob a forma de um tanque cilíndrico, apresenta três partes: a seção superior; seção maior (intermediária), que é preenchida com aparas de madeira, sabugos de milho ou outro material propício à formação de grande área de exposição de ar; e seção inferior (MORETTO *et al.*, 1988; SPINOSA, 1996).

No processo submerso, as bactérias acéticas encontram-se submersas no líquido a fermentar, multiplicando-se e retirando energia da reação de oxidação do álcool etílico a ácido acético. Para catalisar essa reação, que lhes fornece energia, as bactérias acéticas necessitam da administração contínua e adequada de oxigênio em todos os pontos do tanque. Interrupções breves, de minutos apenas, no fornecimento de oxigênio, sobretudo nas fases finais de fermentação, afetam quase que definitivamente o rendimento. Este processo destaca-se pela produtividade, muito superior aos demais processos e, portanto, é o mais adequado aos moldes industriais modernos. O vinagre é produzido entre 24 a 30 horas por tal processo mostra-se turvo, passando por tratamentos de filtração para obter a limpidez adequada (ZANCANARO, 1988; FRINGS, 1996; SPINOSA, 1996).

Existem ainda outros processos para a fabricação do vinagre, tais como o processo por gerador de mergulho, processo *Mackin*, processo *Bourgenois*, processo *Fardon* ou o de Gerador por sifonagem. Entretanto, os três processos básicos comentados anteriormente dão a dimensão histórica da produção do vinagre em escala semi-industrial e industrial. São também eles os processos que melhor confirmam a evolução da tecnologia a partir do componente fundamental para a produção do vinagre: a atuação do oxigênio como fator limitante do processo de acetificação (AQUARONE & ZANCANARO, 1990; SPINOSA, 1996).

Dados de Produção

O Brasil conta com um parque industrial de produção de vinagre por processo submerso composto por 60 unidades fabris. Dentre as mais significativas em termos de produção, duas são de grande porte, com 30.000 m³/ano; há seis unidades de médio porte, que, juntas, produzem 72.000 m³/ano; e existem 37 fábricas de pequeno porte, produzindo, ao todo, 28.000 m³/ano. No Estado do Rio Grande do Sul estão localizadas aproximadamente 90% dessas indústrias. Segundo dados da União Brasileira de Vitivinicultura - UVIBRA, localizada naquele Estado, a produção nacional de vinagre de vinho nos anos de 1999, 2000 e 2001 foi respectivamente de 2.426.530, 6.654.097 e 1.767.848 L. No ano de 2001, a produção de Agrin foi de 7.169.864 L. Entretanto, outras fontes indicam que a produção deve alcançar 130.000 m³/ano de vinagre 'duplo', com concentração de 10% em ácido acético (SPINOSA, 2002).

No Brasil, quem regulamenta o padrão de qualidade e identidade do vinagre é o Ministério da Agricultura. Este, na década de 90, regulamentou e viabilizou a comercialização da marca *Agrin*, marca fantasia de uma mistura composta por 90% de fermentado acético de álcool e 10% de fermentado acético de vinho tinto ou branco, puro, com acidez acética volátil mínima de 4,0g/100ml (AQUARONE & ZANCANARO, 1990; BRASIL, 2001; SPINOSA, 2002).

A adulteração de um vinagre de álcool ou mesmo de ácido acético com a finalidade de fazê-lo passar por vinagre de vinho, pela adição de substâncias como melaço, vinho de uvas, vinagre de vinho, vinhaça ou corantes, constitui-se prática comum em alguns países (inclusive no Brasil) e sua identificação torna-se praticamente impossível pelas análises de rotina efetuadas pelos órgãos responsáveis pela padronização de alimentos e bebidas (AQUARONE & ZANCANARO, 1990).

Segundo dados da Associação Nacional dos Vinagreiros - ANAVI, localizada em Jundiaí, município paulista responsável por 70% da produção do vinagre nacional, o brasileiro consome pouco vinagre: uma família de quatro pessoas gasta, em média, uma

garrafa de 750 ml por mês. O consumo brasileiro situa-se em 0,6 l/ano e na Europa é de 4,0 l/ano.

De acordo com a ACNielsen (2005), a venda de vinagre nos Estados Unidos da América (EUA), no período de 2000 a 2002, aumentou em 15% quando comparado a outros condimentos. Nos últimos 9 anos, esse crescimento foi de 29%. O volume de venda de vinagre envasado gerou um valor superior a US\$200,00 milhões aos supermercados no ano de 2003.

Vinagres de vinho tradicionais são muito apreciados na gastronomia e seu papel econômico vem aumentando rapidamente nas regiões de importância enológica, como o Sul da Espanha. O vinagre de vinho é um condimento importante na dieta Mediterrânea. Longe de ser o simples resultado de uma alteração no vinho, estes vinagres têm se tornado produtos singulares, preciosos e, por melhor dizer, caros (GARCIA PARRILLA *et al.*, 1997).

A produção do vinagre nos países da União Européia (UE) em 1994 foi de cerca de 5,5 milhões de hectolitros (com 10% de acidez), dos quais 63% de álcool, 27,1% de vinho, 6,8% de malte e 3,1% de outras origens. Cerca de 17% da produção é exportada para fora da UE. A tabela 1 mostra dados da produção de vinagre em países da UE (ADAMS, 1998). Segundo ANTONELLI *et al* (1996) a produção italiana e espanhola é quase que exclusivamente de vinho.

O vinagre, com passar do tempo torna-se mais suave com odor e sabor mais agradáveis devido às reações que ocorrem durante o processo de envelhecimento com reações de esterificação que retiram ácidos e alcoóis do meio, fornecendo ésteres aromáticos. Outro tipo de reação que ocorrem são as de oxidação do grupo aldeído, que conferem aspereza ao vinagre. Os vinagres de vinhos de frutas necessitam de alguns meses de envelhecimento enquanto os vinagres de álcool algumas semanas apenas. O envelhecimento deve ser conduzido de preferência em recipientes de madeira, sempre na

ausência de ar, para evitar processos de oxidação do ácido acético, realizados por algumas espécies de *Acetobacter* (AQUARONE & ZANCANARO, 1990).

Tabela 1. Produção de vinagre na União Européia

	VOLUME (hL 10% acidez)
Belgica	172 000
Dinamarca	157 717
Alemanha	1 731 761 ^a
França	1 133 110
Irlanda	9 316
Itália	563 000
Reino Unido	775 800
Espanha	486 213
Portugal	61 519
Áustria	127 150
Finlândia	24 051
Holanda	243 039
TOTAL	5 484 676

^a vendas – Comitê Permanente Internacional de Vinagre (ADAMS, 1998)

2.3 Composição físico-química

A composição química característica de um vinagre depende basicamente da matéria-prima que foi fermentada. Os vinagres obtidos de frutos ou de malte possuem composição mais complexa que o vinagre de álcool por conter praticamente todas as substâncias solúveis existentes na matéria-prima ou que se formaram nos processos fermentativos alcoólico e acético. Por outro lado, o vinagre de álcool contém apenas as

substâncias provenientes do destilado alcoólico, as formadas na fermentação acética e outras poucas adicionadas como nutrientes (AQUARONE & ZANCANARO, 1990)

O vinagre é uma solução aquosa límpida, que pode ser incolor, da cor de sua matéria-prima ou colorida por caramelo. Dependendo do conteúdo de ácido acético e da matéria-prima, sua densidade, pontos de ebulição e fusão, tensão superficial e viscosidade podem diferir mais ou menos dos valores da água pura (EBNER *et al.*, 1996).

A análise dos componentes químicos do vinagre é importante por que possibilita a distinção entre tipos de vinagre e entre solução de ácido acético diluído e colorida (EBNER, 1983).

Vários estudos têm sido feitos sobre a composição do vinagre, principalmente sobre seu conteúdo de vitaminas e minerais. Foram identificados oito aminoácidos em vinagre de álcool além de vitaminas do grupo B. Várias vitaminas são produzidas durante o processo fermentativo, dentre elas riboflavina, nicotinamida e ácido pantotênico. Outros compostos foram identificados em vinagre de álcool, como acetato de etila, acetaldeído, acetona, acetoína e etanol. (EBNER, 1983).

O vinagre de vinho de uva apresenta vitaminas em maiores concentrações que o vinagre de álcool. Alguns aminoácidos, como treonina e ácido glutâmico só são encontrados nessa variedade de vinagre (AQUARONE & ZANCANARO, 1990).

O processo de envelhecimento é responsável por uma série de alterações químicas em vinagres, principalmente no seu conteúdo fenólico. Aldeídos fenólicos formados durante a degradação de lignina que acontece no processo de envelhecimento, resultam no desenvolvimento de excelentes propriedades organolépticas e são responsáveis pelas características de sabor de produtos envelhecidos em madeira (GARCIA PARRILLA *et al.*, 1997).

As operações de envelhecimento do vinho e do vinagre são similares. Entretanto, há uma diferença clara a respeito da matéria prima que é usada como substrato. Deve ser destacado que o envelhecimento do vinho é um processo biológico realizado por uma flora de leveduras, que mantém o produto em redução, enquanto que o envelhecimento do vinagre é um processo oxidativo, no qual as bactérias acéticas são os microrganismos envolvidos. Tanto a flora de levedura quanto a cultura acética estão localizadas na superfície do líquido. Além disso, ambas diferem nas condições alcoólicas e acéticas. As características especiais destes processos têm rendido extensa literatura sobre alterações químicas envolvidas nos vinhos, mas poucos estudos a respeito das alterações ocorridas durante a elaboração do vinagre foram realizados (GARCIA PARRILLA *et al.*, 1999).

2.3.1 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos são compostos de bastante interesse nos produtos derivados de vinho. Alguns estão originalmente presentes na uva e outras frutas e outros aparecem durante a fermentação alcoólica ou acética. A concentração e a natureza dos ácidos orgânicos presentes no vinagre podem dar informações sobre a origem da matéria prima, crescimento microbiológico e até mesmo técnicas de processamento (MORALES *et al.*, 1998).

Um trabalho recente no Brasil, desenvolvido na Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (SAAD-HOSSNE, 2001), chamou atenção por ter concluído, após modelo experimental para estudo de metástase hepática em coelhos portadores de carcinoma VX-2, que o uso de solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico e aquosa de ácido acético acarretaram, após 24 horas, necrose do tecido tumoral. Decorridos sete dias, as áreas destruídas mostraram-se livres de tecido tumoral, ocorrendo regeneração do tecido hepático com focos de fibrose e infiltrado inflamatório. Em pesquisa anterior, o mesmo autor, estudou o efeito da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina injetada na cavidade peritoneal, *in vivo*, em animais com a forma ascítica do tumor e observou uma redução significativa do número de células

tumorais e aumento de células inflamatórias. Esse duplo efeito, segundo o autor, é indicativo de ação antitumoral do ácido acético (SAAD-HOSNE, 1997).

LANKAPUTHRA (1998) estudou a antimutagenicidade de diversos ácidos orgânicos, dentre eles o ácido acético e láctico, ambos presentes no vinagre. Neste estudo, o ácido acético mostrou alta atividade antimutagênica para três dos oito agentes pró-mutagênicos testados em células de *Salmonella typhimurium*.

SAIDI *et al.*, (2001) estudou o uso do vinagre, como fonte natural de ácido acético, no controle da chifrada comum no trigo - doença causada por *Tilletia tritici* and *T. laevis* - que provoca perdas consideráveis da produção de trigo em todo o mundo. O vinagre provou ser uma alternativa muito efetiva no controle a doença, não apresentando efeitos negativos na germinação da semente nem na vitalidade da muda.

BORAZJANI *et al.*, (2003), estudaram o combate ao *vibrium vulnificus* - microrganismo patogênico associado ao consumo de ostras cruas – pelos métodos de ultra-som, ozônio e ácidos orgânicos. Segundo o autor não existem dados científicos disponíveis sobre estes métodos de desinfecção. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos destes tratamentos na inativação deste microrganismo, naturalmente existente em conchas fechadas ou abertas de ostras. Nas conchas fechadas, estes tratamentos não foram efetivos na redução do elemento patogênico, porém em conchas abertas os tratamentos se mostraram mais eficientes, sendo que as conchas tratadas com suco de limão, ácido cítrico e vinagre apresentaram redução significativa do patógeno, superando os tratamentos de ultra-som e ozônio. Apesar destes métodos reduzirem significantemente a população do *v. vulnificus* em ostras cruas, não foram capazes de reduzi-los a níveis aceitáveis.

RUTALA *et al.*, (2000), estudou a eficácia de produtos naturais, como vinagre, e desinfetantes comerciais comuns, contra elementos patógenos para humanos como: *Staphilococos aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. O vinagre apresentou significativa atuação contra *S. aureus* e *E. coli*.

A acidez total do vinagre é expressa em ácido acético, principal ácido orgânico do vinagre, porém outros ácidos orgânicos estão presentes, dentre eles os principais são: tartárico, cítrico, málico, láctico, succínico (COCCHI *et al.*, 2002, GEUM-SOON-OH *et al.*, 2003, MORALES *et al.*, 1998, RIZZON & MIELE, 2001, SANARICO *et al.*, 2003).

Utilizando uma coluna de troca iônica, SANARICO *et al.*, (2003), analisaram em uma única corrida de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), os principais compostos orgânicos do Vinagre Balsâmico Tradicional da Região de Emilia - Itália, incluindo ácidos cítrico, málico, tartárico, láctico, acético e glucônico, além de frutose e glicose. O ácido acético foi o composto encontrado em maior concentração.

Os métodos analíticos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia gasosa (GC), apresentam resultados estatisticamente equivalentes na determinação de ácidos carboxílicos (MORALES *et al.*, 1998, COCCHI, *et al.*, 2002).

Dentre os ácidos orgânicos da uva, o ácido tartárico é o mais importante. É um ácido específico da uva e a videira é uma das raras plantas que o sintetiza em quantidade elevada (RIZZONI & MIELE, 2001). A presença deste ácido na uva e, conseqüentemente, no vinho e vinagre é um indicativo da origem da matéria prima do produto.

Outro ácido presente originalmente na uva é o ácido málico (DÍAZ, 1999). É um importante composto que deve ser monitorado durante a maturação da uva e produção do vinho. O ácido málico é convertido em ácido láctico durante a fermentação malolática, que ocorre posteriormente à fermentação alcoólica. O ácido málico aparece no vinagre em menor quantidade e é muito dependente da origem do vinho, já no vinagre de maçã sua concentração é maior (MORALES *et al.*, 1998, NATERA *et al.*, 2003).

Durante a fermentação malolática, o ácido málico é convertido em ácido láctico conferindo ao vinho mais suavidade ao paladar e menos acidez. A concentração de ácido láctico no vinagre depende da origem do vinho, variando em até 1 g/L. O ácido láctico pode ser oxidado por bactérias do gênero *Acetobacter*, diminuindo, assim, seus níveis de

concentração durante a fermentação acética. (MORALES *et al.*, 1998; NATERA *et al.*, 2003).

O ácido cítrico também se encontra presente originalmente na uva e em frutas cítricas, além de ser formado durante a fermentação alcoólica. Pode, ocasionalmente, servir de substrato para alguns microorganismos, produzindo ácido acético (MORALES *et al.*, 1998).

O ácido succínico acompanha a fermentação do açúcar no vinho, e sua quantidade não se altera ao longo do processo de conservação do vinho (DÍAZ, 1999).

2.4 Compostos Antioxidantes

2.4.1 Espécies reativas de oxigênio

O oxigênio é essencial para a vida, entretanto, a estrutura eletrônica do O_2 favorece sua redução por adição de um elétron levando à geração de radicais de oxigênio que podem causar dano celular. Um radical é definido como uma molécula com um elétron não-pareado muito reativo num orbital externo, que pode iniciar uma cadeia de reações pela remoção de um elétron de outra molécula para completar seu orbital (BEATTIE, 2003).

A transferência passo a passo de elétrons para O_2 resulta na formação dos seguintes intermediários, apresentados na Figura 03: ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila livre ($OH\bullet$), sendo o último o radical livre mais perigoso, uma vez que está envolvido em reações como peroxidação de lipídeos e geração de outros radicais tóxicos. O peróxido de hidrogênio não é um radical livre, mas é convertido, pelas reações de Fenton ou de Haber-Weiss, no radical hidroxila, em presença de Fe^{2+} ou de Cu^+ , prevalentes em células (Figura 04).

A produção de radicais livres é uma consequência fisiológica de diversos processos metabólicos no organismo, sendo também secundária a uma série de injúrias exógenas como bactérias e outros organismos (BEATTIE, 2003), as fontes endógenas e exógenas de

radicais livres são: luz ultravioleta, raios X, interação com metais de transição (ferro e cobre), metabolismo de fármacos, metabolismo aeróbio e presença de doenças com resposta inflamatória (Figura 05)

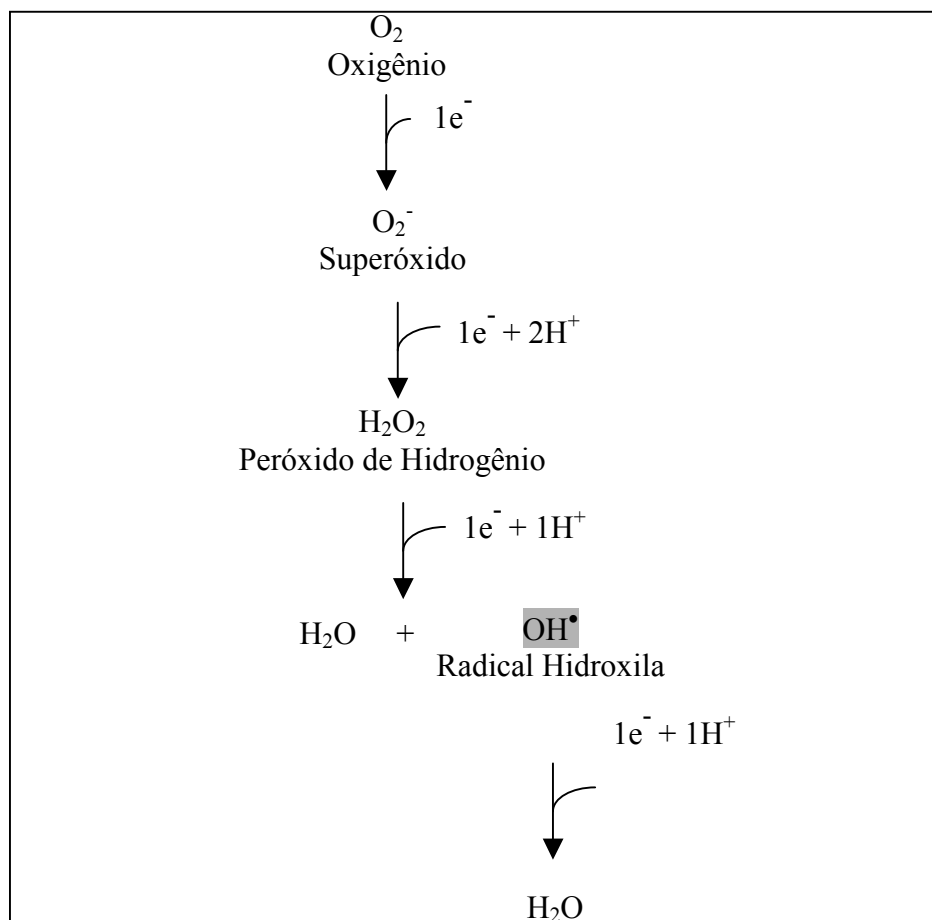


Figura 3: Etapas de um elétron na redução do oxigênio, levando à formação das espécies reativas de oxigênio superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. Fonte: BEATTIE, 2003

Estes radicais causam alterações nas células, agindo diretamente sobre alguns componentes celulares. Um exemplo são os ácidos graxos poliinsaturados das membranas, que são muito vulneráveis ao ataque dos radicais livres. Os radicais livres podem provocar também modificações nas proteínas celulares, resultando em sua fragmentação, ligações cruzadas (*cross linking*), agregação e, em certos casos, ativação ou inativação de certas enzimas devido à sua reação com aminoácidos constituintes da cadeia polipeptídica. A reação de radicais livres com ácidos nucleicos também é observada, podendo gerar mudanças em moléculas de DNA (SOARES, 2002).

O aumento dos radicais livres é observado em qualquer condição clínica que envolva isquemia e reperfusão, como por exemplo, choque seguido de ressuscitação, liberação de obstrução intestinal, transplante de órgãos e revascularização de membros isquemiados (GALIZIA, 2001).

CHEUNG *et al.*, (2000), estudaram a formação de radicais livres durante o infarto do miocárdio e observaram que a administração de antioxidantes contribuiu na diminuição de lesões do tecido isquêmico, sugerindo a investigação de novos métodos para a proteção contra este tipo de lesão. Em modelos animais, estudaram os efeitos de antioxidantes que bloquearam a geração de radicais de oxigênio durante episódios de infarto do miocárdio.

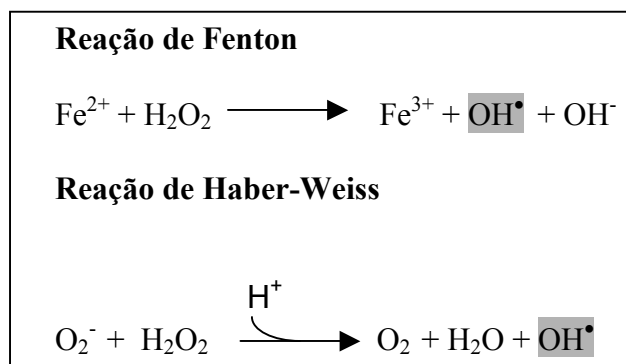


Figura 4: As reações de Fenton e Haber-Weiss para formação do radical hidroxila tóxico. Fonte: BEATTIE, 2003

A consequência mais importante da liberação de radicais livres é o dano ao DNA, tanto mitocondrial como nuclear, resultando em mutações. As células desenvolveram múltiplas formas de se protegerem contra os efeitos deletérios dos radicais livres, produzindo enzimas que agem como antioxidantes. As principais enzimas que fazem parte do grupo de antioxidantes enzimáticos são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GP) (ARUOMA, 1994; FREI, 1999; BEATTIE, 2003).

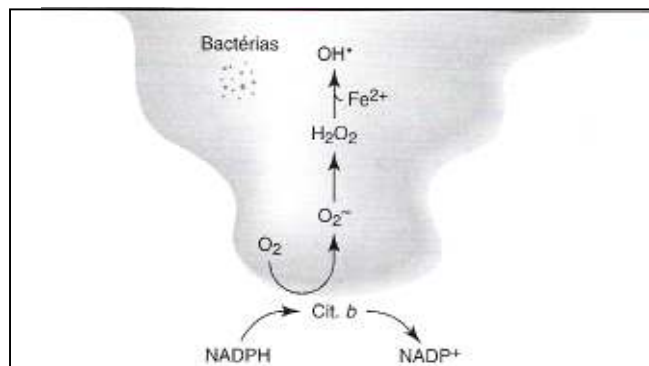


Figura 5: Explosão respiratória em fagócitos (Uma cadeia de transferência de elétrons envolve uma transferência de elétrons do citocromo b singular, de NADPH para oxigênio, com formação de ânion superóxido. Superóxido é convertido no radical hidroxila, que mata bactérias endocitadas por fagócitos - BEATTIE, 2003).

Os antioxidantes não enzimáticos são pequenas moléculas e constituintes protéicos que viabilizam a proteção celular e principalmente a proteção do plasma contra radicais livres, já que este contém poucas enzimas antioxidantes. Ácido ascórbico, retinol e tocoferol (vitaminas C, A e E, respectivamente), ácido úrico e algumas proteínas (ceruloplasmina, albumina, transferrina, haptoglobina e hemopexina) constituem os principais antioxidantes não enzimáticos. Além destes, compostos fenólicos existentes nas uvas vermelhas têm apresentado importante ação contra o estresse oxidativo e no curso natural de doenças crônicas, merecendo crescente interesse de pesquisas científicas (THOMAS, 2003; ARAUJO, 2001)

2.4.2 Compostos fenólicos

Fenóis são compostos que apresentam hidroxila ligada diretamente a um núcleo benzênico. Vários polifenóis (que apresentam mais que 3 hidroxilas ligadas ao anel benzênico) distribuídos na natureza apresentam ação antioxidante e têm sido associados com a redução do desenvolvimento de doenças crônicas. Englobam desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização. Os fenóis largamente distribuídos na natureza estão divididos em dois grandes grupos: os flavonóides e derivados e os ácidos fenólicos (SOARES, 2002).

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes tanto para alimentos como para o organismo, sendo, por isso, indicado para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e outras doenças (SOARES, 2002).

Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Estruturalmente, constituem substâncias aromáticas com quinze átomos de carbono (C_{15}) no seu esqueleto básico, sendo compostos fenólicos os que possuem nessa estrutura anéis aromáticos $C_6-C_3-C_6$. Alguns flavonóides apresentam efeito antioxidante quatro vezes maior que a vitamina E, por exemplo. As fontes alimentares de flavonóides incluem maçãs, cebola, vinho tinto, chocolate, frutas vermelhas, frutas cítricas e chá verde e vários estudos observaram a redução do risco cardiovascular na presença de alta ingestão desse grupo de substâncias (RICE-EVANS *et al.*, 1996; HERTOOG *et al.*, 1993, ARTS *et al.*, 2001).

Atualmente, é amplamente aceito que compostos antioxidantes desempenhem uma função crucial na prevenção de doenças, cujas causas estejam relacionadas ao stress oxidativo celular, graças a sua capacidade de captura, desativação ou reparo de danos causados pelos radicais livres, que são implicativos em tais doenças. Frutas, verduras e todos os alimentos e bebidas derivados, são ricos em compostos polifenólicos, que têm sido estudados como antioxidantes poderosos. Portanto, os efeitos protetores à saúde, derivados do consumo de tais alimentos, têm sido atribuídos à quantidade e qualidade dos polifenóis presentes (SOARES, 2002).

Os antioxidantes fenólicos funcionam como seqüetradores de radicais, assim, os compostos fenólicos e alguns de seus derivados são eficazes para prevenir a oxidação lipídica, atuando como antioxidantes nos alimentos e no organismo, seqüestrando radicais livres, removendo espécies reativas de oxigênio, que são iniciadores da inflamação crônica.

Além disso, alguns compostos fenólicos atuam diretamente na inibição da lipoxigenase, uma mediadora da resposta inflamatória (SOARES, 2002; FINLEY, 2004).

Em particular, a relação entre o consumo de vinho e a prevenção de doenças cardiovasculares e certos cânceres, entre outros, têm sido amplamente estudada. A grande vantagem do vinho como fonte de polifenóis na dieta é que, no vinho, estes estão presentes no estado solúvel e por isso mais disponíveis biologicamente, enquanto em outras frutas e vegetais, estes estão fortemente complexados (a proteínas) e, portanto, menos facilmente absorvidos ou biodisponíveis. Nos produtos derivados do vinho, compostos polifenólicos também estão presentes e podem contribuir para uma ação antioxidante. Mesmo nos produtos derivados do vinho, numerosos polifenóis têm sido encontrados e atualmente são extraídos e usados em composições farmacêuticas (ALONSO *et al.*, 2004).

O consumo de vinho tinto é elevado na Itália e França, aproximadamente quatro vezes mais que nos demais países da União Européia. Este disparate de consumo de vinho tinto leva a crer ser a razão do "paradoxo Francês", onde a França apresenta uma das menores taxas de mortalidade por doenças coronárias, apesar do elevado consumo de gorduras saturadas e níveis séricos de colesterol semelhantes ao da Comunidade Européia e Estados Unidos (COOPER & THURNHAM, 2004).

COOPER & THURNHAM (2004), mostram que polifenóis de vinho tinto tem efeito pequeno nas concentrações de lipídios no plasma, mas o consumo constante parece reduzir sensivelmente a capacidade oxidante do LDL e o aumento da capacidade antioxidante do soro, além disso, os polifenóis presentes no vinho tinto apresentam a habilidade de relaxar os vasos sanguíneos.

Em seu trabalho, FINLEY (2004) afirma que os antioxidantes presentes na dieta podem ser efetivos no retardo ou prevenção de doenças inflamatórias crônicas. Como exemplo cita o resveratrol, presente nas uvas, que tem apresentado ação biológica notável contra doença cardiovascular, algumas formas de câncer e artrite.

CARLUCCIO *et al.*, (2003) comprovou por meio de cultura de células endoteliais de aorta bovina que a presença de resveratrol (fitoalexina contida no vinho tinto) inibiu a expressão de moléculas de adesão (VCAM- 1) quando em doses nutricionalmente relevantes, demonstrando efeito antiinflamatório e possivelmente a atividade antiaterogênica de alguns compostos fenólicos do vinho.

O resveratrol tem sido objeto de diversos estudos, que sugerem além do efeito protetor cardíaco outros benefícios, como proteção contra desordens inflamatórias, acidente vascular cerebral, traumas de medula espinhal e câncer. Apesar de a maioria destes efeitos só estar comprovada em animais de laboratório, vários estudos epidemiológicos sugerem que o risco de morte por problemas cardíacos e até câncer é menor entre pessoas que ingerem baixas quantidades de vinho tinto do que entre abstêmios. Não há um consenso a respeito do consumo de suco de uva ao invés do vinho, faltando alternativas comprovadas para o consumo do resveratrol para quem não quer ou não pode consumir álcool (PIVETTA, 2005).

Apesar do vinho tinto possuir quantidades significativas de trans- resveratrol (1,5 a 7 mg/L) e de flavonóides (1000-4000mg/L), seu consumo regular não tem sido estimulado em função dos efeitos deletérios do consumo elevado do etanol, que incluem, além da hepatotoxicidade, elevação da trigliceridemia, glicemia, aumento da pressão arterial e favorecimento do ganho de peso (COSTA *et al.*, 2004).

Estudo realizado na cidade de São Paulo analisou a eficácia do uso de bebida derivada do vinho tinto sem a presença de etanol comparada ao vinho tinto, em coelhos hipercolesterolêmicos induzido pela dieta. O grupo de coelhos que consumiu ração rica em colesterol associada ao vinho tinto apresentou menor formação de placas ateroscleróticas em aorta comparada ao grupo que consumiu a mesma ração com alto teor de colesterol com o derivado de vinho tinto sem etanol. Entretanto, houve diferença importante entre o segundo grupo e o controle, inferindo que mesmo sem etanol, compostos fenólicos presentes em uvas vermelhas apresentam efeito antiaterogênico (DA LUZ *et al.*, 1999) .

No Japão, SHIMOJI et al (2002) analisou a atividade antioxidante do vinagre de arroz integral (Kurosu) relacionando sua grande atividade antioxidante à presença de compostos fenólicos, principalmente o ácido dihidroxiferúlico (DFA) e ácido dihidroxisináptico (DAS), além dos ácidos ferúlico, sináptico, vanílico, e p-hidroxiciânico. Segundo o autor, a presença dos ácidos DFA e DAS contribui para a atividade antitumoral.

Estudos feitos *in vitro* e em pele de camundongos, sugerem um efeito antitumoral atribuído ao vinagre Kurosu, devido principalmente às propriedades antioxidantes, além de seqüestro de radicais livres e interferência na geração de novos radicais livres (NISHIDAI *et al.*, 2000).

YAMAJI *et al.*, (2001), sugerem que a introdução do Kurosu na dieta poderia reduzir o perigo de arteriosclerose. Em seu estudo, Yamaji examinou a atividade de seqüestro de radicais livres pela redução do DPPH (Difenil-1-Picrilhidrazil) e o efeito antioxidante sobre as lipoproteínas de baixa densidade humana (LDL), confirmando-as.

DZIEDZIC & HUDSON (1984) mediram a eficiência de alguns ácidos fenólicos como antioxidantes em sistema lipídico, empregando o Rancimat[®] e verificou que, dentre outros ácidos a atividade antioxidante significativa do ácido gálico.

NATERA *et al.*, (2003), estudaram a composição fenólica, compostos aromáticos e conteúdo de ácidos orgânicos de 83 amostras de vinagres de diferentes matérias primas (vinho branco, vinho tinto, maçã, mel, álcool, balsâmico e malte), com e sem envelhecimento em madeira. Observaram que os vinagres envelhecidos em madeira apresentaram maior composição fenólica e maior produção de compostos voláteis conforme o período de envelhecimento.

MIYAKAMA *et al.* (2003), após examinar as propriedades antioxidantes, pelo método de seqüestro de radical DPPH, do vinagre envelhecido em madeira propôs o seu uso como um aditivo alimentar.

A caracterização específica de produtos alimentícios é importante para estabelecer parâmetros de controle de qualidade como origem botânica e geográfica, e para detecção de misturas fraudulentas. Nesse sentido, os componentes fenólicos têm sido sugeridos como indicadores de origem e variação e suposta autenticidade, funcionando como uma impressão digital de vinhos e seus derivados (GARCIA PARRILLA *et al.*, 1997).

GARCIA PARRILLA *et al.* (1997) diferenciaram vinagres de vinho Sherry e vinagres “El Condado” quanto ao conteúdo fenólico. O processo de envelhecimento para o vinagre Sherry segue o sistema de “solera”, enquanto o vinagre “El Condado” é envelhecido em um único barril. O sistema de “solera” é composto de três a quatro barris contendo vinagre em processamento. O barril mais alto contém vinagre mais novo e o barril de baixo, o vinagre mais antigo. Três ou quatro vezes por ano uma quantia de vinagre é retirada de cada barril. O conteúdo dos barris de um mesmo nível é misturado e distribuído entre os barris do nível seguinte. A homogeneização do produto é realizada em todas as etapas do sistema. Pode-se dizer que alguma quantidade de vinagre novo pode alcançar os barris do chão, o que explica a presença do ácido cafeoiltartárico no produto final. Entretanto, nos vinagres “El Condado” o processo de envelhecimento segue um sistema estático realizado em um único barril, o que impede o contato com vinagres mais novos. É esperado que o ácido cafeoiltartárico sofra reação de oxidação em meio ácido, se tornando ausente na maioria dos vinagres envelhecidos.

3 MATERIAL & MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Amostras

Trinta e sete amostras de vinagres adquiridas em supermercados ou mediante doação, de diferentes fabricantes brasileiros foram analisadas. Estas amostras foram divididas em 9 categorias de acordo com a matéria-prima fermentada. (tabela 2).

A categoria vinagre de álcool foi subdividida em vinagres de álcool das marcas presentes no mercado e vinagre de álcool envelhecidos em madeira no laboratório.

3.1.2 Equipamentos

- Cromatógrafo Líquido - Shimadzu
- Espectrofotômetro digital- Femto
- Rotaevaporador – Tecnal
- Banho-maria – Tecnal
- Balança analítica – Tecnal
- Potenciômetro – Tecnal
- Micropipetas

3.1.3 Reagentes

- Ácido acético - Sigma
- Ácido aconítico - Sigma
- Ácido butírico - Sigma
- Ácido cítrico - Sigma
- Ácido gálico -
- Ácido láctico - Sigma
- Ácido linoléico
- Ácido málico - Sigma
- Ácido perclórico - Sigma
- Ácido succínico - Sigma
- ácido tartárico - Sigma
- Carbonato de Sódio
- Clorofórmio
- Difenil-1-Picrilhidrazil (DPPH)
- Etanol - Merck
- Reagente Follin Ciocauteau
- Tween 80 - Merck
- β -caroteno

Tabela 2. Categorias de vinagres analisados e seu código de identificação

Categoria de vinagre	Código de Identificação	Número de amostras
Vinagre de Vinho Tinto marca 1	VT1	3
Vinagre de Vinho Tinto marca 2	VT2	
Vinagre de Vinho Tinto marca 3	VT3	
Vinagre de Vinho Branco marca 1	VB1	2
Vinagre de Vinho Branco marca 2	VB3	
Vinagre de Arroz marca 1	VAR1	5
Vinagre de Arroz marca 3	VAR3	
Vinagre de Arroz marca 4	VAR4	
Vinagre de Arroz marca 5	VAR5	
Vinagre de Arroz marca 6	VAR6	
Vinagre de Maçã marca 1	VM1	3
Vinagre de Maçã marca 2	VM2	
Vinagre de Maçã marca 3	VM3	
Vinagre de Laranja marca 2	VL2	1
Agrin Branco (vinho branco/álcool) marca 1	AB1	3
Agrin Branco (vinho branco/álcool) marca 2	AB2	
Agrin Branco (vinho branco/álcool) marca 3	AB3	
Agrin Tinto (vinho tinto/álcool) marca 1	AT1	3
Agrin Tinto (vinho tinto/álcool) marca 2	AT2	
Agrin Tinto (vinho tinto/álcool) marca 3	AT3	
Balsâmico	B1	1
Vinagre de Álcool marca 1	VAL1	15
Vinagre de Álcool marca 2	VAL2	
Vinagre de Álcool Puro (sem ação de madeira)	VALP	
Vinagre de Álcool em madeira Carvalho 5 dias	VALC5	
Vinagre de Álcool em madeira Carvalho 10 dias	VALC10	
Vinagre de Álcool em madeira Carvalho 15 dias	VALC15	
Vinagre de Álcool em madeira Carvalho 20 dias	VALC20	
Vinagre de Álcool em madeira Carvalho 25 dias	VALC25	
Vinagre de Álcool em madeira Carvalho 30 dias	VALC30	
Vinagre de Álcool em madeira Cabriúva 5 dias	VALB5	
Vinagre de Álcool em madeira Cabriúva 10 dias	VALB10	
Vinagre de Álcool em madeira Cabriúva 15 dias	VALB15	
Vinagre de Álcool em madeira Cabriúva 20 dias	VALB20	
Vinagre de Álcool em madeira Cabriúva 25 dias	VALB25	
Vinagre de Álcool em madeira Cabriúva 30 dias	VALB30	
Total		37

3.2 Metodologia

3.2.1 Quantificação e determinação de ácidos orgânicos

A identificação e quantificação dos ácidos orgânicos foi realizada em duplicata, por cromatografia líquida de alta eficiência em Cromatógrafo Líquido (Shimadzu High Performance Liquid Chromatograph), sistema composto de Bomba (LC 10AD), amostrador manual, Forno das colunas (CTO – 10A VP), Detector UV-Visível (SPD – 10A) e Coluna empacotada de alta eficiência (SCR 101 CH), Sistema Aquisição de dados (CBM 101), Software CLASS LC 10, todos da marca Shimadzu.

A fase móvel foi composta por ácido perclórico 10mM pH 2,0, fluxo de 1,2 mL/min, com tempo de eluição de, aproximadamente, 15 minutos por amostra à temperatura de 50°C. As amostras foram preparadas diluindo-se o vinagre em água ultrapurificada (Milli-Q-Plus) na proporção 1:50.

Foram utilizados, como referência, os seguintes padrões de ácidos orgânicos: aconítico, cítrico, tartárico, málico, succínico, láctico, acético e butírico, todos da marca Sigma.

3.2.2 Determinação dos compostos fenólicos totais

O conteúdo de fenóis totais nas amostras de vinagre foi analisado segundo o método descrito por ALONSO et al (2004), onde em um balão de 25 mL foi adicionado uma alíquota de vinagre (volume apropriado para cada tipo de vinagre), 10 mL de água destilada, 1,5 mL de reagente de Follin Ciocautau, 5 mL de carbonato de sódio 20% e o volume completado para 25 mL com água destilada.

Após 30 min para estabilização da coloração, em temperatura ambiente, a leitura foi feita em espectrofotômetro a 750 nm. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. Como branco foi utilizado, no lugar do vinagre, água destilada. Os valores foram expressos em mg de ácido gálico por mL de vinagre, através da construção de uma curva padrão.

3.2.3 Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada pela oxidação acoplada do β -caroteno e ácido linoléico, segundo metodologia de HEMMERSCHIMIDT & PRATT (1978), adaptada para este estudo. Cinco mg de β -caroteno foram dissolvidos em 5 mL de clorofórmio e transferidos a um balão de fundo redondo contendo 111 μ L de ácido linoléico 60% e 185 μ L de Tween 80. Após remoção do clorofórmio em um rotaevaporador a 40°C, 50 mL de água deionizada e aerada foram adicionadas ao balão sob rigorosa agitação para emulsificação. A emulsão obtida foi diluída na proporção 1:10.

Alíquotas de emulsão e vinagre na proporção 1:1 foram transferidas para tubos de ensaio. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 470 nm imediatamente após adição da amostra à emulsão. Os tubos foram incubados a 40°C e leituras seqüentes foram realizadas em intervalos de 15 min até 150 min.

Foram preparados tubos controle com água no lugar da amostra de vinagre.

Cálculo da taxa de branqueamento (oxidação) do β -caroteno

A taxa de branqueamento (oxidação) do β -caroteno foi determinada pela diferença entre a absorvância inicial e final da amostra, a 470 nm, dividido pelo tempo de incubação (horas). O índice de antioxição foi calculado pela razão entre a taxa de branqueamento controle e a taxa de branqueamento da amostra, segundo PRATT e BIRAC (1979).

Expressões:

$$Tb = \frac{Absi - Absf}{Tempo(h)} \quad Iox = \frac{Tb \text{ controle}}{Tb \text{ amostra}}$$

Onde: Tb – Taxa de branqueamento

Absi – Absorvância Inicial

Absf – Absorvância Final

Iox – Índice de antioxição

3.2.4 Determinação da atividade seqüestrante de radicais livres

A atividade seqüestrante de radicais livres foi determinada segundo a metodologia de NISHIDAI et al (2000), utilizando como anti-oxidantes padrão: ácido ascórbico, cisteína, α -tocoferol e ácido gálico, contra o composto DPPH (Difenil-1-Picrilhidrazil).

Uma alíquota de 1 mL de solução contendo amostra em tampão tris-HCl, em diferentes proporções de acordo com a amostra, foi adicionada a 1 mL de DPPH 500 μ M em etanol. A mistura foi agitada vigorosamente e deixada por 20 min em repouso à temperatura ambiente no escuro. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 517 nm.

Os resultados foram expressos por atividade relativa em porcentagem de seqüestro do radical livre, estipulando leitura de absorbância em 1,200 para 0% de atividade e 0,110 para 100% de atividade, segundo descrito na metodologia e validado em laboratório.

O índice de Atividade Seqüestrante de Radicais Livres foi calculado em função da concentração de ácido Gálico que atinge 50% de atividade.

3.2.5 Vinagre de álcool envelhecido em madeira

Foi conseguido, mediante doação de uma indústria, cerca de 30 Litros de vinagre de álcool produzido pelo método submerso, com 6% de acidez, sendo a filtração o único processamento sofrido pelo produto. Este vinagre foi dividido em 3 galões de 10 Litros cada. No primeiro, foram adicionados cubos de madeira Carvalho Americano (*Quercus rubra*), no segundo, cubos de madeira Cabriúva (*Mycrocarpus frondous*) e no terceiro nada foi adicionado. Os galões foram acondicionados por trinta dias à temperatura ambiente ao abrigo da luz.

Amostras para as análises foram retiradas a cada 5 dias em um período de 30 dias. Foram realizados análises de fenóis totais, atividade antioxidante e seqüestro do radical DPPH pelos métodos descritos anteriormente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação de ácidos orgânicos

As concentrações em partes por milhão (ppm) dos ácidos aconítico, cítrico, tartárico, málico, succínico, láctico, acético e butírico das amostras de vinagre estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 Concentrações(ppm) dos ácidos aconítico, cítrico, tartárico, málico, succínico, láctico, acético e butírico das amostras de vinagre estudadas.

Amostra	Aconítico	Cítrico	Tartárico	Málico	Succínico	Láctico	Acético	Butírico
B1	0,00	0,00	4385,17	5161,37	4200,16	927,94	26544,53	0,00
VT1	460,64	97,73	1550,17	193,61	2764,42	969,22	16675,36	0,00
VT2	0,00	129,14	1613,89	2018,28	1417,04	851,88	21316,92	0,00
VT3	0,00	0,00	235,90	0,00	145,90	0,00	33616,70	0,00
VB1	381,68	531,55	1079,89	193,94	1816,70	465,99	17126,81	0,00
VB3	0,00	36,05	174,00	0,00	168,10	95,80	30330,70	0,00
AT1	345,16	28,65	129,39	60,73	150,80	0,00	17318,01	0,00
AT2	394,82	37,02	292,49	112,28	611,22	294,17	17433,49	0,00
AT3	0,00	0,00	129,82	0,00	124,04	0,00	21039,49	0,00
AB1	359,77	40,43	134,65	0,00	161,98	226,11	17641,42	0,00
AB2	350,37	0,00	169,96	118,15	528,45	341,75	17660,71	0,00
AB3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	19063,29	0,00
VAL1	373,92	28,57	130,75	72,72	0,00	0,00	17036,30	0,00
VAL2	365,05	34,87	135,73	72,19	133,76	0,00	17625,36	0,00
VM1	354,35	586,23	0,00	207,33	1425,58	878,76	18340,95	0,00
VM2	346,90	52,33	274,06	325,10	1667,64	788,75	17747,03	0,00
VM3	350,68	33,47	135,83	79,23	0,00	221,59	18394,03	0,00
VAR1	350,19	0,00	250,19	173,07	1221,78	1052,32	16977,81	0,00
VAR3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	22086,05	0,00
VAR4	0,00	0,00	118,10	168,71	1268,68	1472,88	17475,49	0,00
VAR5	351,07	646,93	859,78	1328,08	1136,85	594,39	34037,29	2505,83
VAR6	373,82	0,00	500,85	290,26	2786,16	222,11	19542,53	265,25
VL2	0,00	0,00	294,46	402,32	1768,09	621,50	18515,00	0,00

VT: vinagre de vinho tinto; VB: vinagre de vinho branco; VAR: vinagre de arroz; VM: vinagre de maçã; VL: vinagre de laranja; AB: agrin branco (vinho branco/álcool); AT: agrin tinto (vinho tinto/álcool); B: vinagre balsâmico; VAL: vinagre de álcool. Os números que seguem a codificação indicam a marca de origem.

O ácido acético apareceu em quantidade elevada em todas as amostras avaliadas, confirmando ser ele o principal ácido orgânico do vinagre, por ser produzido na fermentação acética. A presença dos demais ácidos pode ser um indicativo do tipo de matéria-prima fermentada, ou até mesmo contaminação microbiana (MORALES *et al.*, 1998, COCCHI *et al.*, 2002, NATERA *et al.*, 2003).

A ausência de ácido cítrico em algumas amostras de vinagre pode ser explicada pelo fato deste composto servir de substrato para alguns microorganismos, produzindo ácido acético (MORALES *et al.*, 1998). No entanto, apesar da variação nas concentrações, em nenhum dos trabalhos consultados verificou-se a ausência deste composto (PLESSI *et al.*, 1989, MORALES *et al.*, 1998, COCCHI *et al.*, 2002).

A presença em concentração elevada do ácido tartárico nos vinagres balsâmico e de vinhos tinto e branco da marca 1 e no vinagre de vinho tinto da marca 2 pode ser a confirmação da utilização de uva como matéria-prima (RIZZONI & MIELE, 2001). Os vinagres de vinho tinto e branco da marca 3 apresentam concentrações baixas desse ácido (235,9 e 174,0 ppm, respectivamente), próximas às encontradas nos *Agrins*, o que sugere a utilização de outras matérias-primas na produção desses vinagres, tais como açúcar de cana e etanol.

O ácido málico, presente originalmente na uva e na maçã também foi encontrado em quantidade expressiva no vinagre balsâmico da marca 1 e no vinagre de vinho tinto da marca 2. Esse ácido é convertido em ácido láctico durante a fermentação malolática, etapa facultativa na produção de vinhos destinados à fermentação acética. O ácido láctico pode surgir também pela presença de bactérias lácticas contaminantes nas fermentações (AQUARONE & ZANCANARO, 1990; MORALES *et al.*, 1998).

A presença expressiva do ácido láctico no vinagre de vinho tinto da marca 1 e a pequena quantidade de ácido málico nesta mesma amostra seria um indicativo do uso de vinho que passou pela fermentação malolática. Já os valores observados no vinagre balsâmico da marca 1 – quantidade de ácido málico muito superior à de láctico – sugerem

que neste produto foi utilizado vinho que não passou pela fermentação malolática. Em seu trabalho de determinação de ácidos orgânicos de vinagres balsâmicos, PLESSI *et al.* (1989) também verificaram uma maior concentração de ácido málico do que de ácido láctico nas amostras avaliadas. A alta concentração de substâncias ácidas em vinagres balsâmicos pode ser atribuída às fermentações sucessivas que ocorrem ao longo dos anos (PLESSI *et al.*, 1989).

Os vinagres de vinhos tinto e branco da marca 3 não apresentaram os ácidos málico e láctico ou apresentaram apenas traços desses elementos. Apesar da variabilidade na presença desses ácidos por fatores como o tratamento enológico, origem do vinho e fermentação do ácido láctico por bactérias acéticas, a ausência desses compostos parece mostrar a não utilização de uva como única matéria-prima (PLESSI *et al.*, 1989, MORALES *et al.*, 1998, COCCHI *et al.*, 2002, NATERA *et al.*, 2003)

Segundo MORALES *et al.* (1998), vinagres de maçã apresentam uma concentração representativa de ácido málico, o que não foi encontrado nas amostras dessa categoria. Em contra partida, as amostras das marcas 1 e 2 apresentaram consideráveis concentrações de ácido láctico. NATERA *et al.* (2003) encontrou resultados semelhantes ao estudar a composição de vinagres de maçã e justificou a baixa concentração de ácido málico e alta concentração de láctico pela ocorrência de fermentação malolática. O vinagre de maçã da marca 3 apresentou baixas quantidades dos dois compostos.

Nos vinagres de álcool era esperada a presença apenas de ácido acético (AQUARONE & ZANCANARO, 1990, NATERA *et al.*, 2003), no entanto, nas duas amostras foram encontrados traços de outros ácidos orgânicos, vindos provavelmente da linha de produção, comum às outras categorias.

As amostras de vinagre de arroz apresentaram maior variedade nos ácidos orgânicos estudados, sendo que as amostras das marcas 5 e 6 foram as únicas que apresentaram ácido butírico. Os cromatogramas estão apresentados nas figuras A2 a A23, evidenciando a presença de fonte distinta de fermentação.

4.2 Determinação dos compostos fenólicos totais

Os resultados obtidos nas análises para fenóis totais estão apresentados na tabela 4. Estes resultados são as médias das análises feitas em triplicata com seu respectivo desvio padrão, em função do ácido gálico, composto empregado como padrão.

Tabela 4. Índice de fenóis totais das amostras de vinagres analisadas (mg de ácido Gálico por mL de vinagre).

Amostra	Fenóis Totais	
	(mg ác gál/mL)	DP
B1	67,205	0,275
VT1	9,722	0,059
VT2	24,164	0,286
VT3	2,712	0,025
VB1	5,780	0,206
VB3	1,025	0,003
AT1	0,747	0,010
AT2	1,369	0,017
AT3	0,257	0,007
AB1	0,551	0,001
AB2	0,458	0,004
AB3	0,162	0,001
VAL1	0,022	0,001
VAL2	0,236	0,005
VM1	3,805	0,047
VM2	2,095	0,057
VM3	0,189	0,002
VAR1	1,506	0,005
VAR3	0,200	0,003
VAR4	1,401	0,007
VAR5	1,511	0,009
VAR6	3,078	0,026
VL2	1,234	0,014

VT: vinagre de vinho tinto; VB: vinagre de vinho branco; VAR: vinagre de arroz; VM: vinagre de maçã; VL: vinagre de laranja; AB: agrin branco (vinho branco/álcool); AT: agrin tinto (vinho tinto/álcool); B: vinagre balsâmico; VAL: vinagre de álcool. Os números que seguem a codificação indicam a marca de origem.

O vinagre balsâmico da marca 1, única empresa brasileira a produzir esse tipo de vinagre, apresentou a maior concentração de fenóis totais (67,205 mg/mL), o que já era esperado, por ser um produto cuja matéria prima (uva) apresenta alto teor de polifenóis. Além disso, seu processo de fabricação envolve envelhecimento em barris de madeira, processo que permite aos polifenóis passarem da madeira para os produtos envelhecidos (GARCIA-PARRILLA *et al.*, 1999; ALONSO *et al.*, 2004).

GARCIA-PARRILLA *et al.* (1999), que estudaram vinagres de vinho Sherry, vinho tradicional da região de Jerez na Espanha, o qual é envelhecido em barris de carvalho americano, comprovaram a transferências de polifenóis da madeira para o vinagre, comparando a permanência do vinagre na madeira e o aumento da concentração de polifenóis no mesmo. Neste mesmo trabalho, os autores verificaram que o ácido gálico aumentou com o envelhecimento em barris antigos e, como resultado, foram obtidas altas concentrações deste componente em muitos vinagres envelhecidos. Segundo os autores, este fato é explicado pela hidrólise de galotaninos durante o envelhecimento.

As amostras de vinagre de vinho tinto apresentaram grande variação no conteúdo de fenóis totais, mesmo sendo produtos de mesma categoria no mercado consumidor. As principais fontes de compostos fenólicos nesses vinagres são a uva e a madeira (RICE-EVANS & MILLER, 1996; HERTOOG *et al.* 1993, ARTS *et al.*, 2001, ALONSO, 2004; GARCIA PARRILLA *et al.*, 1999). A amostra do fabricante 2 foi a que apresentou maior índice, provavelmente pelo uso de reatores de madeira na fabricação do vinagre. A empresa que produz a marca 1 possui reatores com corpo em aço inox, sem influência no conteúdo de fenóis. Apesar da empresa que produz a marca 3 contar também com reatores de madeira, seu produto obteve o menor índice de fenóis totais, o que sugere utilização de matéria-prima de qualidade inferior ou adulteração.

As amostras de vinho branco (marcas 1 e 3) também apresentaram variação significativa. O produto da marca 1 apresentou valor muito superior ao da marca 3, o que reafirma a sugestão da utilização de matéria-prima de qualidade inferior ou adulteração da amostra. Comparando vinagres de vinho tinto e branco das mesmas marcas, verifica-se um

conteúdo fenólico muito menor nos de vinho branco. Isso pode ser explicado pela maior concentração de compostos fenólicos na casca da uva, que não é utilizada na produção de vinho branco (SINGLETON *et al.*, 1978).

Os vinagres do tipo *Agrin* apresentaram índice de fenóis inferior aos de vinho tinto, tendo o *Agrin* tinto maior teor de fenóis que o branco em todas as marcas. Comparando os produtos similares, os índices do *Agrin* tinto mantiveram o mesmo padrão do vinagre de vinho tinto, sendo o produto da marca 2 o de maior teor, seguido dos produtos das marcas 1 e 3. Nos produtos das marcas 1 e 2 observou-se índices similares para *Agrin* branco, 0,551 e 0,458 mg/mL respectivamente, quando o esperado era que o produto da marca 2 obtivesse maior resultado, por ser uma empresa que conta com reatores de madeira (GARCIA-PARRILLA *et al.*, 1999; ALONSO *et al.*, 2004). Isso sugere o uso de menor concentração de vinagre de vinho branco na composição do *Agrin* branco da marca 2. A marca 3 apresentou, mais uma vez, o menor índice de fenóis para esta categoria.

Os vinagres de álcool apresentaram índices de fenóis que contribuem para afirmação de que os produtos da marca 2 possuem maior teor de fenóis totais, na maioria dos casos, devido ao seu processamento envolver reatores confeccionados em madeira (ALONSO, 2004, GARCIA PARRILLA *et al.*, 1999). A amostra de vinagre de álcool da marca 2 possui maior conteúdo fenólico que a de *Agrin* branco da marca 3, produto que, pela legislação, deve conter 10% de vinagre de vinho branco (BRASIL, 2001).

Os índices observados para a categoria vinagre de maçã foram maiores para o produto da marca 1 (3,805) seguido pelo da marca 2 (2,095). Esses dados indicam uso de matéria-prima de variedades diferentes ou de qualidade inferior pela marca 2, uma vez que esta trabalha com reatores de madeira. Novamente, a marca 3 apresentou resultado baixíssimo (0,189), próximo aos resultados do vinagre de álcool, o que indica utilização de matéria-prima de baixa qualidade ou de mistura hidroalcoólica. No Brasil não há legislação que permita ou regule a mistura de vinagre de álcool ao de maçã.

As amostras de vinagre de arroz podem ser agrupadas em três subgrupos. O primeiro, formado pelo vinagre da marca 6, apresentou o mais alto teor de fenóis (3,078). O segundo grupo, formado pelos produtos das marcas 1, 4 e 5 apresentou teor de fenóis, entre 1,401 e 1,511. O vinagre da marca 3 forma o terceiro grupo, de mais baixa concentração (0,200). O melhor resultado do vinagre da marca 6 pode ser justificado pelo uso de arroz não polido (integral), que de acordo com NISHIDAI, S. et al, (2000) e SHIMOJI, Y. et al (2002), apresenta maior índice de fenóis totais. Os vinagres das marcas 1 e 4 são produzidos pelo mesmo fabricante, o que justifica a proximidade dos resultados. Mais uma vez, o produto da marca 3 obteve o pior resultado, próximo aos teores dos vinagres de álcool, indicando uso de matéria-prima de outra categoria, como o álcool de cana.

NISHIDAI *et al.* (2000) em seu estudo sobre a supressão da peroxidação lipídica em epitélio de rato, analisaram o conteúdo fenólico total de algumas variedades de vinagre. O Kurosu, vinagre de arroz não polido, obteve a maior concentração de fenóis totais, seguido pelos vinagres de maçã, arroz, cereais e vinho. A amostra de vinagre de arroz não polido da marca 6, no entanto, apresentou 3,078 mg de ácido gálico/mL, sendo esta concentração menor que a das amostras de vinagre de maçã da marca 1 (3,805 mg/mL), de vinho branco da marca 1 (5,780 mg/mL), de vinho tinto das marcas 1 e 2 (9,722 e 24,164 mg/mL respectivamente) e vinagre balsâmico da marca 1 (67,205 mg/mL). O vinagre de arroz não polido da marca 6 não pode ser tido como similar ao Kurosu, pois devem ser consideradas as peculiaridades da produção desse tradicional vinagre japonês.

Apenas a marca 2 possui vinagre de laranja, sendo que este apresentou 1,234mg de ácido gálico por mL de vinagre.

O próximo passo para um futuro trabalho, seria a identificação dos compostos fenólicos presentes nas amostras com maior teor destes compostos. A identificação poderia gerar dois resultados muito importantes: o primeiro, a correlação da presença de algum composto em particular com a atividade antioxidante; e o segundo, identificar alterações ou práticas de processamento inadequado pelas indústrias.

4.3 Determinação da atividade antioxidante

A Tabela 5 apresenta os resultados dos índices de antioxição, determinados pela oxidação acoplada do β -caroteno e ácido linoléico, seguindo a metodologia estabelecida por HEMMERSCHIMIDT & PRATT (1978). Esta metodologia é amplamente citada em estudos sobre a capacidade antioxidante de alimentos vegetais e pôde ser empregada sem dificuldades para análise de vinagres comerciais (PRATT & WATTS, 1964; HEMMERSCHIMIDT & PRATT, 1978; PRATT & BIRAC, 1979; PARK et al., 1998).

Os índices foram calculados de acordo com as expressões do item 4.2.3. segundo PRATT e BIRAC (1979).

Tabela 5. Índice de antioxição. Calculado pela razão entre a taxa de branqueamento controle e a taxa de branqueamento das amostras.

Amostra	Índice de Antioxição	Amostra	Índice de Antioxição
VT1	5,203	VAL1	1,412
VT2	58,714	VAL2	1,705
VT3	2,222	VM1	2,446
VB1	3,114	VM2	1,447
VB3	1,457	VM3	1,657
AT1	2,258	VAR1	1,575
AT2	2,186	VAR3	1,720
AT3	1,939	VAR4	1,412
AB1	2,097	VAR5	2,141
AB2	1,885	VAR6	2,258
AB3	1,843	VL2	1,035

VT: vinagre de vinho tinto; VB: vinagre de vinho branco; VAR: vinagre de arroz; VM: vinagre de maçã; VL: vinagre de laranja; AB: agrin branco (vinho branco/álcool); AT: agrin tinto (vinho tinto/álcool); VAL: vinagre de álcool. Os números que seguem a codificação indicam a marca de origem.

O vinagre de vinho tinto da marca 2 apresentou o maior ação antioxidante (58,714), mais de dez vezes superior ao segundo colocado, o vinagre de vinho tinto da marca 1

(5,203). Vale lembrar que o vinagre de vinho tinto da marca 2 não se encontra no mercado, tendo sido fornecido diretamente pelo fabricante.

As amostras de vinagre de vinho branco apresentaram ação antioxidante mais baixas e, como no caso do vinagre de vinho tinto, o produto da marca 1 obteve maior índice que o da marca 3. A marca 2 não possui este produto no mercado.

Ao contrário do que foi visto com os vinagres de vinho tinto, os *Agrins* tintos das três marcas apresentaram resultados muito semelhantes (2,258; 2,186; 1,939 respectivamente).

As amostras de *Agrin* tinto apresentaram resultados conflitantes com os de vinagre de vinho tinto, ou seja, a amostra da marca 1 apresentou resultado um pouco melhor que a da marca 2. Nas amostras de vinagre de álcool, o produto da marca 2, assim como no vinagre de vinho tinto, obteve maior ação antioxidante, o que sugere uma diferença nas matérias primas utilizadas na produção de *Agrin*.

A diferença entre o índice de antioxidação do vinagre de vinho tinto (2,222) e do *Agrin* tinto (1,939) da marca 3 foi muito pequena se comparada com a diferença entre os produtos das marcas 1 e 2. Os resultados de vinagre de vinho branco e *Agrin* branco, 1,457 e 1,843, respectivamente, mostram maior índice no produto que teoricamente é produzido com menor concentração de vinho branco.

A comparação dos resultados dos vinagres de arroz mostra maior ação antioxidante no produto da marca 6, o único produzido com arroz integral. Apesar de ser o melhor resultado da categoria, o vinagre de arroz da marca 6 teve resultados menores ou similares que os de vinho tinto, branco e de maçã. Os estudos realizados com Kurosu, vinagre de arroz não polido, produzido no Japão mostram resultados bem diferentes dos encontrados, uma vez que nesse trabalho, o Kurosu supera as demais categorias de vinagres quanto à atividade antioxidante (SHIMOJI *et al.*, 2002; NISHIDAI *et al.*, 2000; YAMAGUCHI *et al.*, 1998).

Os dados de atividades antioxidante estão apresentados na Figura 6, sendo omitido o resultado do vinagre de vinho tinto da marca 2, pela disparidade no resultado.

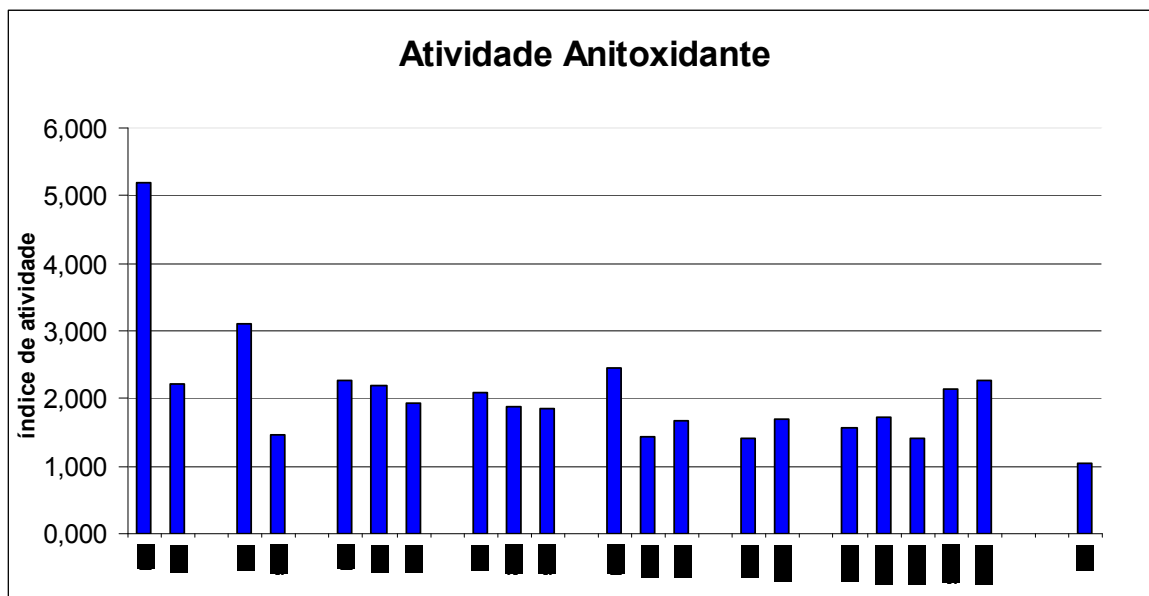


Figura 6. Atividade antioxidante das amostras de vinagre em estudo.

O índice foi calculado pela razão entre o taxa de branqueamento controle e a taxa de branqueamento das amostras.

VT: vinagre de vinho tinto; VB: vinagre de vinho branco; VAR: vinagre de arroz; VM: vinagre de maçã; VL: vinagre de laranja; AB: agrin branco (vinho branco/álcool); AT: agrin tinto (vinho tinto/álcool); VAL: vinagre de álcool. Os números que seguem a codificação indicam a marca de origem.

Os resultados obtidos, especialmente os de vinagres de vinho tinto e branco, demonstram uma possível relação entre o conteúdo de fenóis totais e a ação antioxidante, como mostram a Tabela 6 e Figura 7. Nos resultados obtidos nas análises de *Agrin* tinto e branco, entretanto, não foi encontrada uma boa correlação. Os valores das marcas 1 e 2 para a concentração de fenóis totais foi sempre superior aos da marca 3, fato que não se observa na determinação da atividade antioxidante, em que as três marcas apresentaram resultados muito semelhantes. Isso pode ser explicado pelo fato de cada polifenol ter um diferente poder antioxidante em função de sua estrutura química (ALONSO *et al.*, 2004). Além

disso, é sabido que existe a adição de antioxidantes artificiais nesses produtos, principalmente naqueles com alta concentração de vinagre de álcool.

Tabela 6. Resultados de fenóis totais e índice de antioxição em amostras de vinagres de vinho tinto e branco.

Amostra	fenóis totais (mg ác gál/mL)	Índice de antioxição
VT1	9,722	5,203
VT2	24,164	58,714
VT3	2,712	2,222
VB1	5,780	3,114
VB3	1,025	1,457

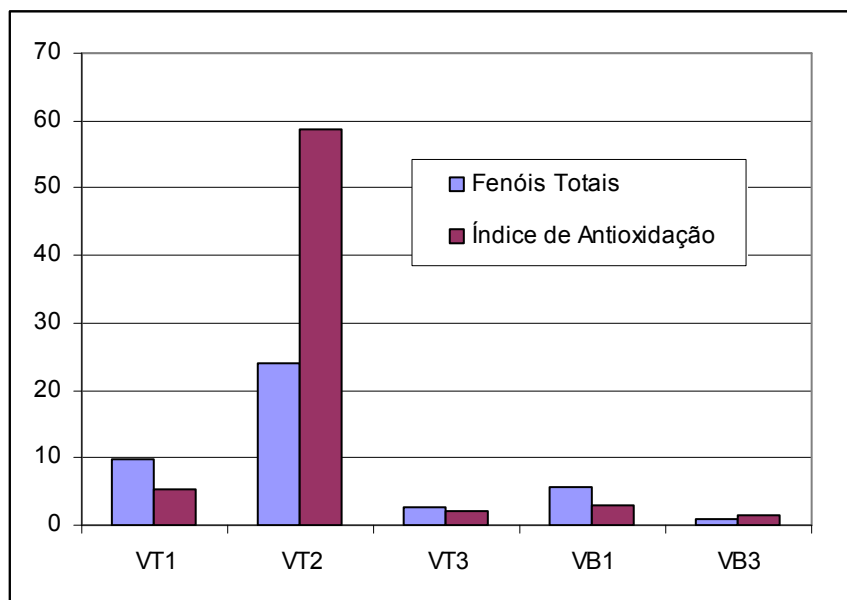


Figura 7. Fenóis totais e índice de antioxição em amostras de vinagres de vinho tinto e branco.

VT: vinagre de vinho tinto; VB: vinagre de vinho branco; VAR: vinagre de arroz; VM: vinagre de maçã; VL: vinagre de laranja; AB: agrin branco (vinho branco/álcool); AT: agrin tinto (vinho tinto/álcool); VAL: vinagre de álcool. Os números que seguem a codificação indicam a marca de origem.

4.4 Determinação da atividade de seqüestro de radicais livres

Para a determinação da capacidade de seqüestro de radicais livres foi analisada a ação de diferentes antioxidantes conhecidos no seqüestro do radical DPPH. Os antioxidantes testados foram cisteína, α -tocoferol e os ácidos ascórbico e gálico, como padrão contra as amostras de vinagre, e seus resultados se encontram na Figura A1 (Anexo).

Por ter obtido o maior índice de seqüestro de DPPH – menor concentração micromolar de amostra para obter a taxa de 50% de seqüestro – e por ter sido usado como padrão para determinação dos fenóis totais, o ácido gálico foi escolhido como referência neste experimento.

A Tabela 7 apresenta os resultados das análises de seqüestro de radicais livres das amostras de vinagre com base na atividade seqüestrante do ácido gálico. O índice de atividade de seqüestro de radical DPPH foi expresso em μM de ácido gálico/ μL de vinagre e também em porcentagem da atividade seqüestrante do ácido gálico.

A amostra que apresentou maior atividade seqüestrante de radicais livres foi a de vinagre de vinho tinto da marca 2, que obteve 3,723% da atividade seqüestrante do ácido gálico. As demais amostras apresentaram atividade abaixo de 0,15%, sendo que o vinagre de vinho tinto da marca 1 teve o segundo melhor desempenho, com 0,138%.

Em todas as categorias encontrou-se uma disparidade elevada entre as marcas analisadas, apesar de os produtos serem vendidos como similares. Enquanto o vinagre de maçã da marca 1 obteve o terceiro melhor resultado entre as amostras (0,071%), o mesmo produto da marca 3, não apresentou nenhuma atividade de seqüestro de radical DPPH. Esses resultados reforçam a não padronização da produção de vinagre no país.

Tabela 7. Resultados das análises de seqüestro de radicais livres das amostras de vinagre com base na atividade seqüestrante do ácido gálico.

Amostra	Atividade $\mu\text{mol ac Gál}/\mu\text{L}$	% relativa de atividade*
VT1	7,334	0,138%
VT2	197,859	3,723%
VT3	0,588	0,011%
VB1	0,521	0,010%
VB3	0,211	0,004%
AT1	0,864	0,016%
AT2	0,934	0,018%
AT3	0,040	0,001%
AB1	0,119	0,002%
AB2	0,203	0,004%
AB3	0,000	0,000%
VAL1	0,139	0,001%
VAL2	0,353	0,000%
VM1	3,755	0,071%
VM2	0,256	0,005%
VM3	0,000	0,000%
VAR1	0,343	0,006%
VAR3	0,000	0,000%
VAR4	0,447	0,008%
VAR5	0,097	0,002%
VAR6	0,825	0,016%
VL2	0,206	0,004%

* usou-se a ação do ácido gálico como referência

VT: vinagre de vinho tinto; VB: vinagre de vinho branco; VAR: vinagre de arroz; VM: vinagre de maçã; VL: vinagre de laranja; AB: agrin branco (vinho branco/álcool); AT: agrin tinto (vinho tinto/álcool); VAL: vinagre de álcool. Os números que seguem a codificação indicam a marca de origem.

Dentre os vinagres de arroz analisados, o da marca 6, feito com arroz não polido, foi o que obteve maior atividade de seqüestro (0,016%), estando, contudo muito abaixo do valor obtido pelo vinagre de vinho tinto da marca 2. A literatura que trata do vinagre de arroz integral Kurosu, fabricado no Japão, apresenta resultados diferentes. NISHIDAI *et al.* (2000) verificaram que o Kurosu e o vinagre de maçã apresentaram atividade seqüestrante muito maior do que os vinagres de arroz polido, uva e cereais. SHIMOJI *et al.* (2002) obtiveram resultados similares comparando Kurosu e vinagre de arroz polido.

As Figuras 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22 mostram fotografias de análises de seqüestro de DPPH realizadas nas diferentes categorias de vinagre. Quando o radical DPPH é seqüestrado por um antioxidante, através da doação de um hidrogênio formando DPPH-H, a coloração muda de violeta para amarela (YAMAGUCHI, *et al.*, 1998). As Figuras 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 e 23 são os gráficos da concentração (ppm) das amostras pela porcentagem de atividade seqüestrante de radical DPPH relativa, separados por categoria.



Figura 8. Análise de seqüestro de radical DPPH em vinagre de vinho tinto da marca 2.

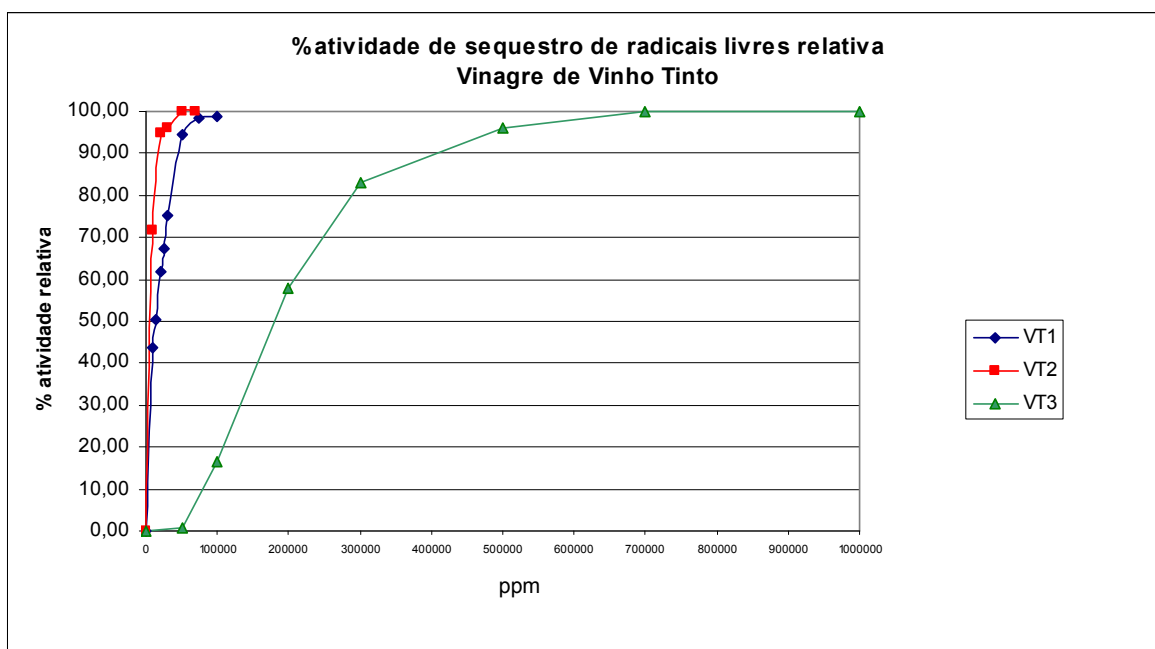


Figura 9. Análises de seqüestro de radical DPPH em vinagres de vinho tinto.

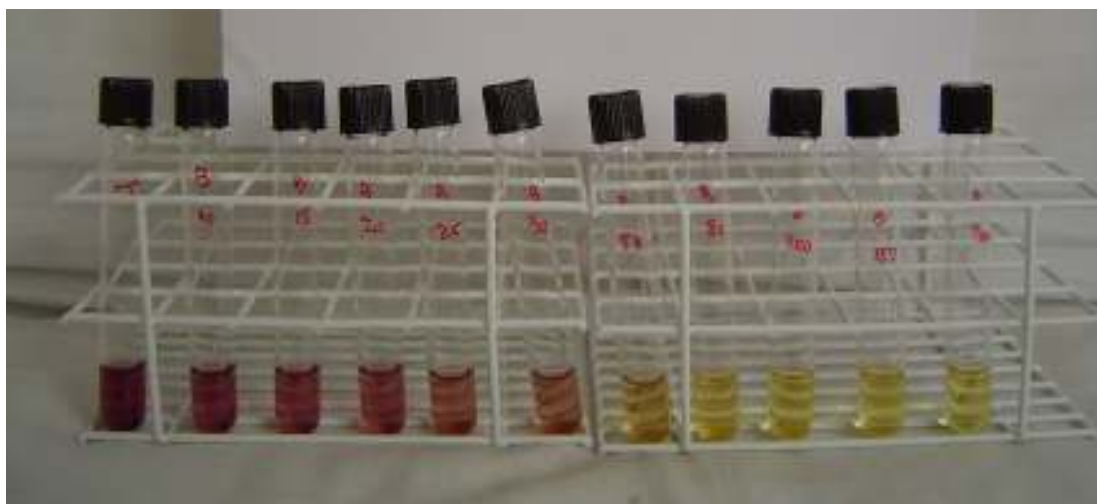


Figura 10. Análise de seqüestro de radical DPPH em vinagre de vinho branco da marca 1.

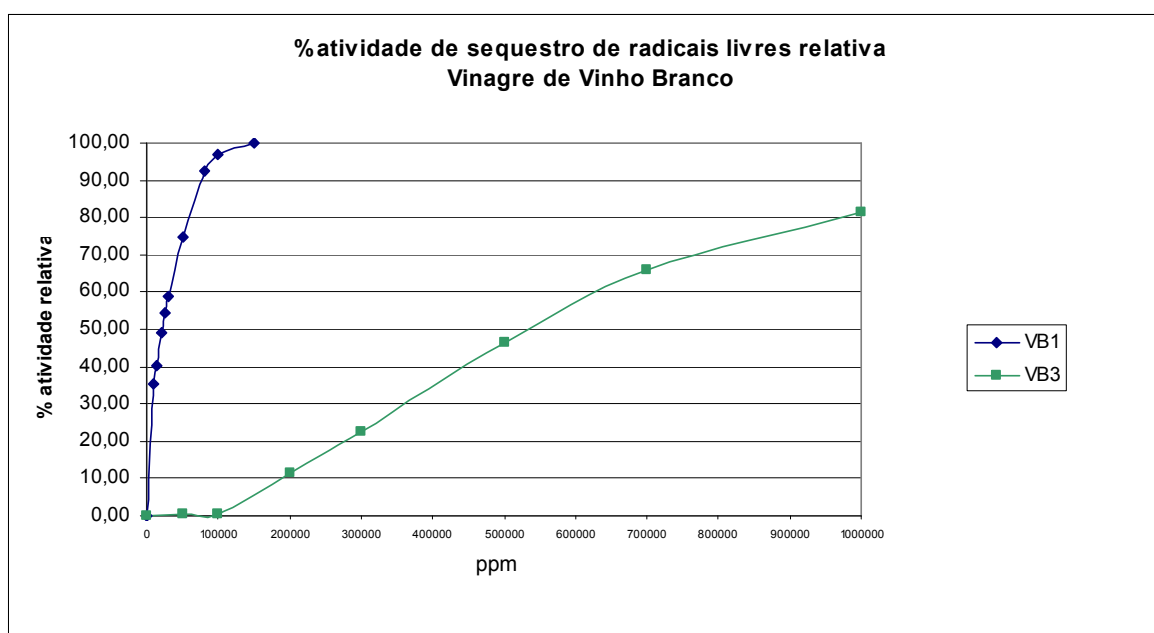


Figura 11. Análises de seqüestro de radical DPPH em vinagres de vinho branco.



Figura 12. Análise de seqüestro de radical DPPH em *Agrin* tinto da marca 2.

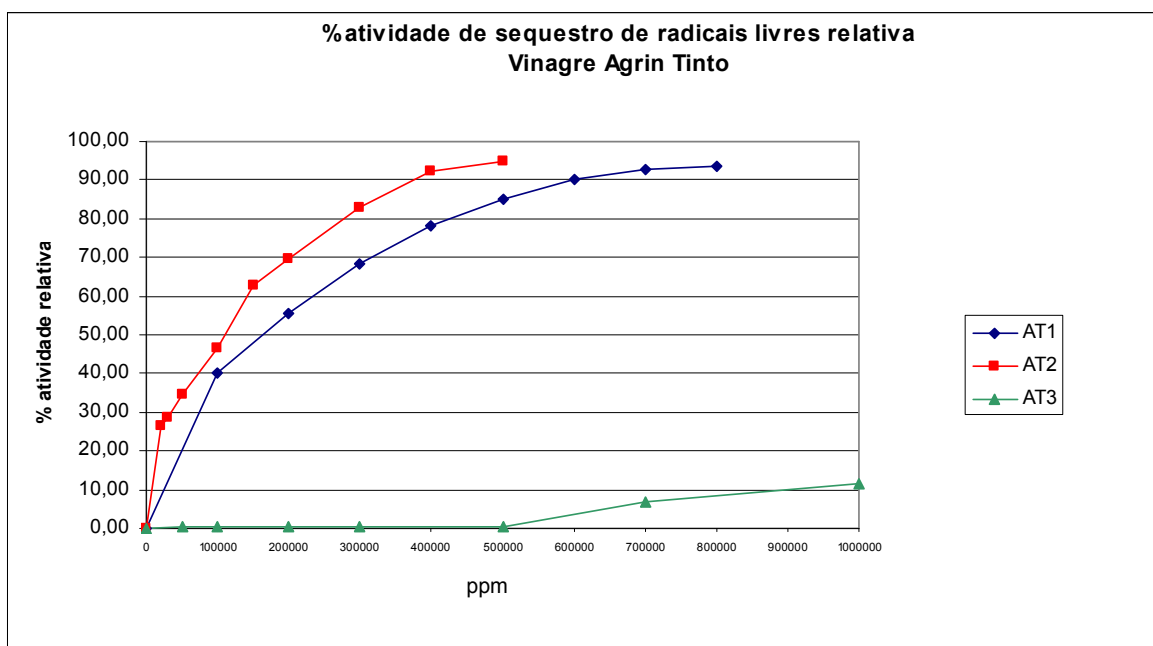


Figura 13. Análises de seqüestro de radical DPPH em *Agrins* tintos.

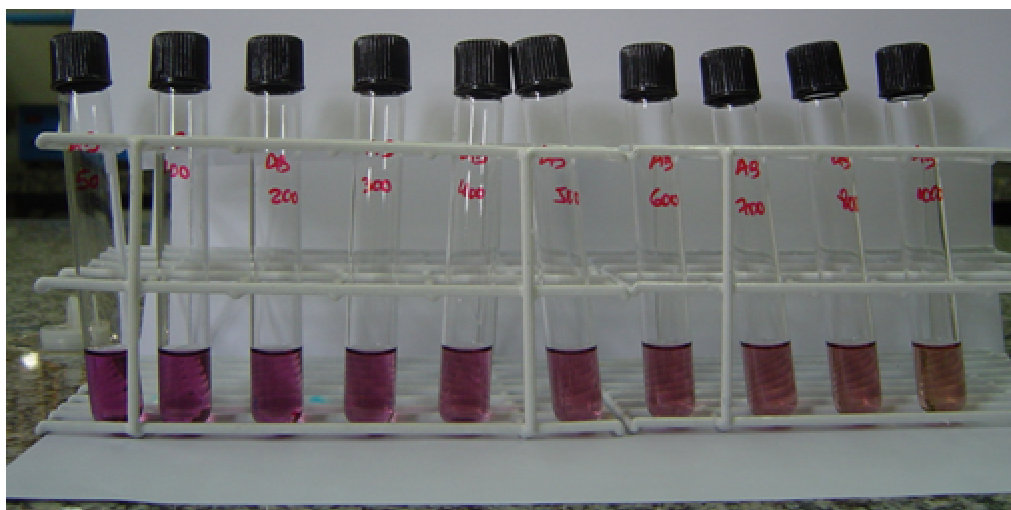


Figura 14. Análise de seqüestro de radical DPPH em *Agrin* branco da marca 1.

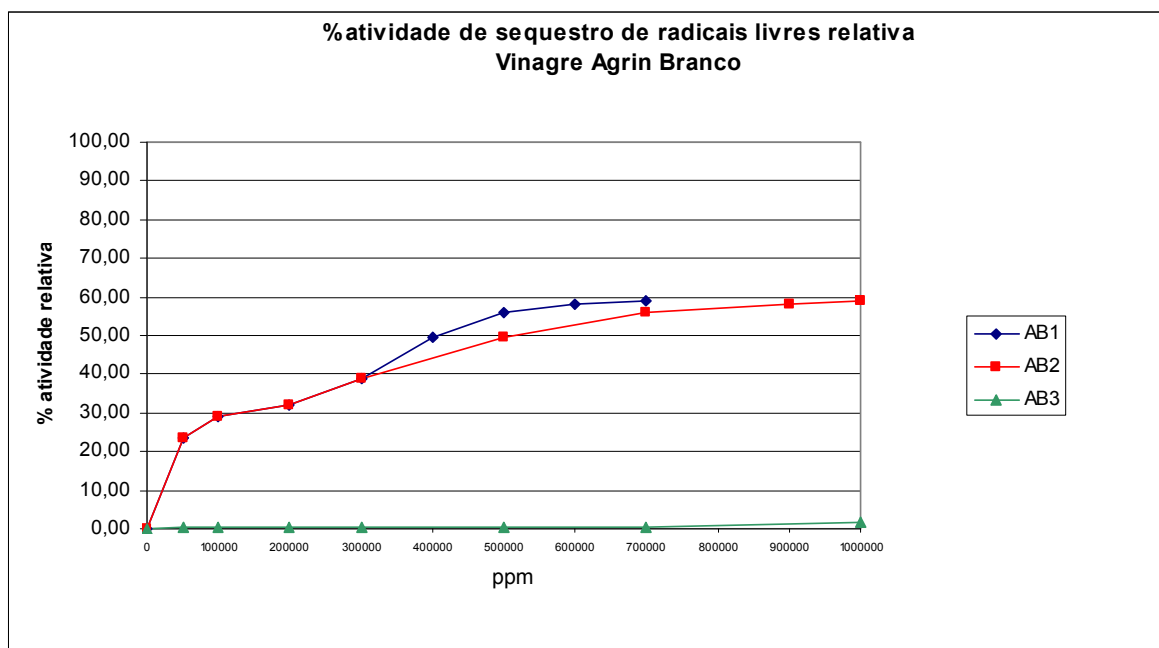


Figura 15. Análises de seqüestro de radical DPPH em *Agrins* brancos.

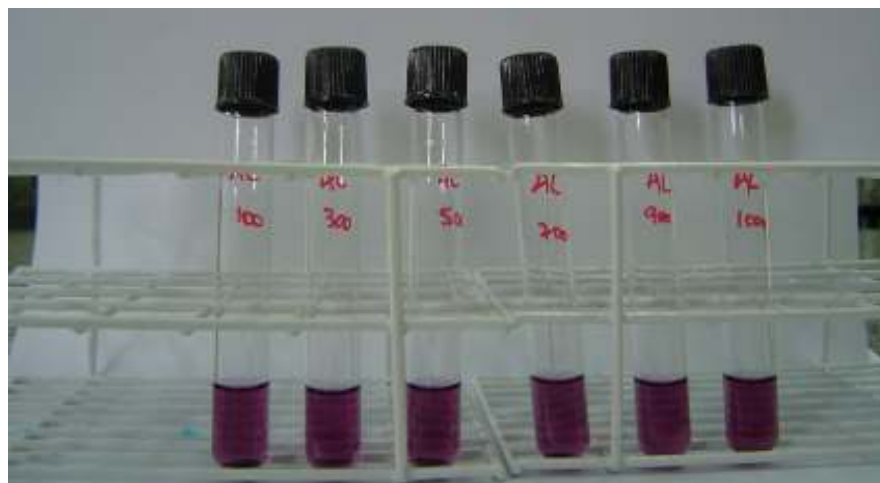


Figura 16. Análise de seqüestro de radical DPPH em vinagre de álcool da marca 1.

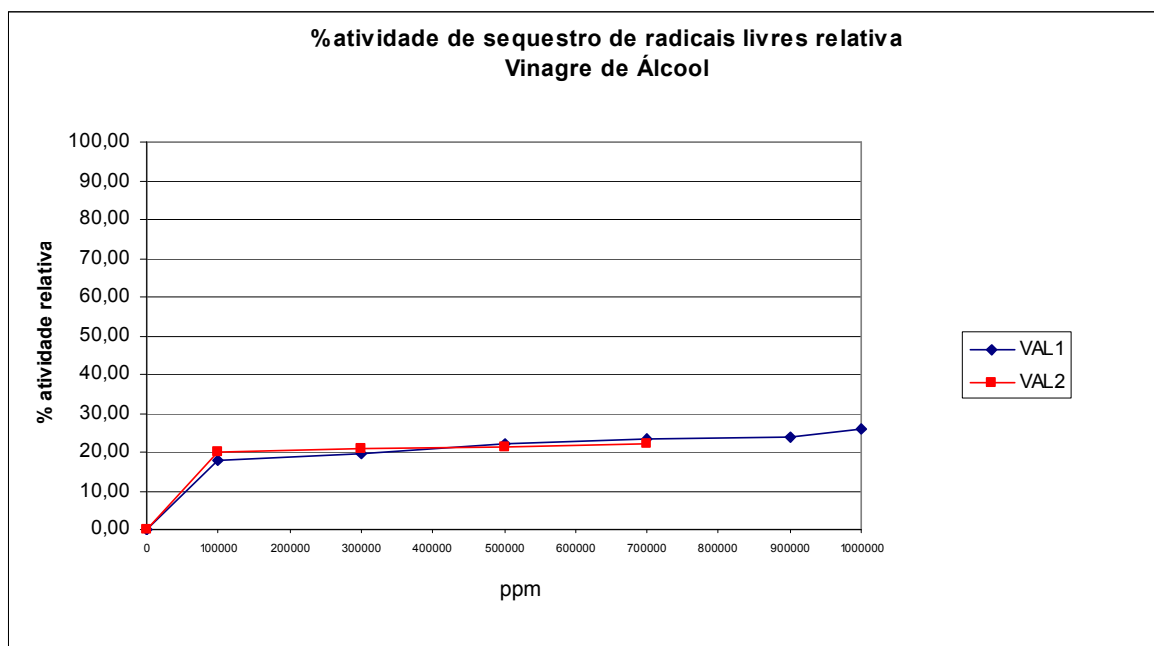


Figura 17. Análises de seqüestro de radical DPPH em vinagres de álcool.



Figura 18. Análise de seqüestro de radical DPPH em vinagre de maçã da marca 1.

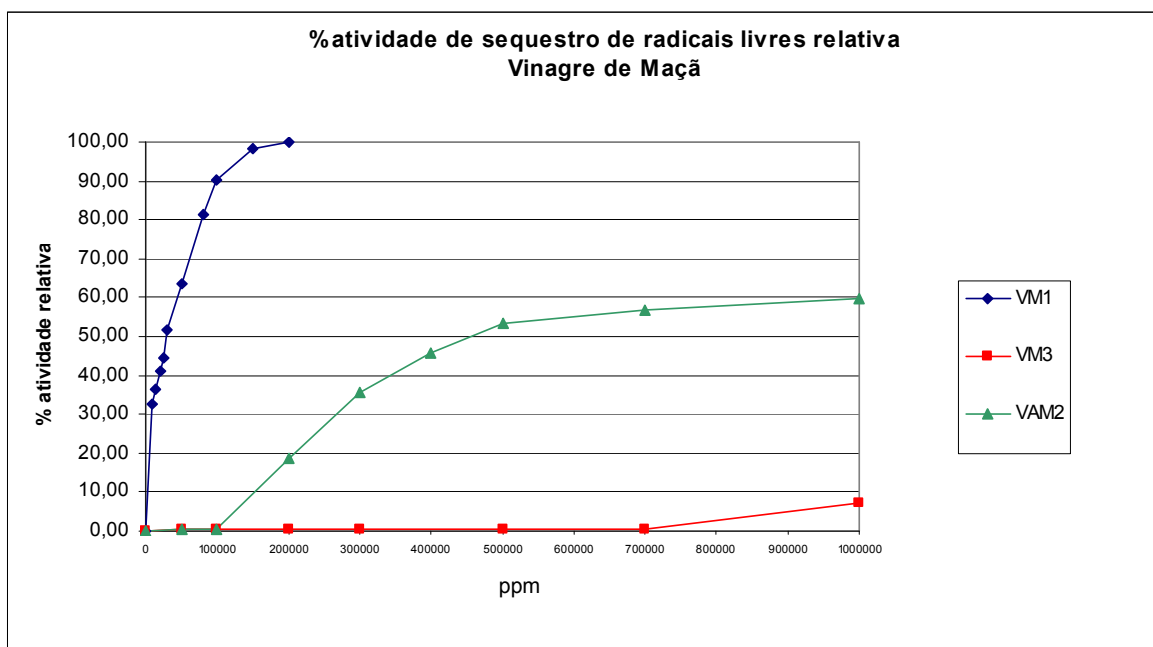


Figura 19. Análises de seqüestro de radical DPPH em vinagres de maçã.

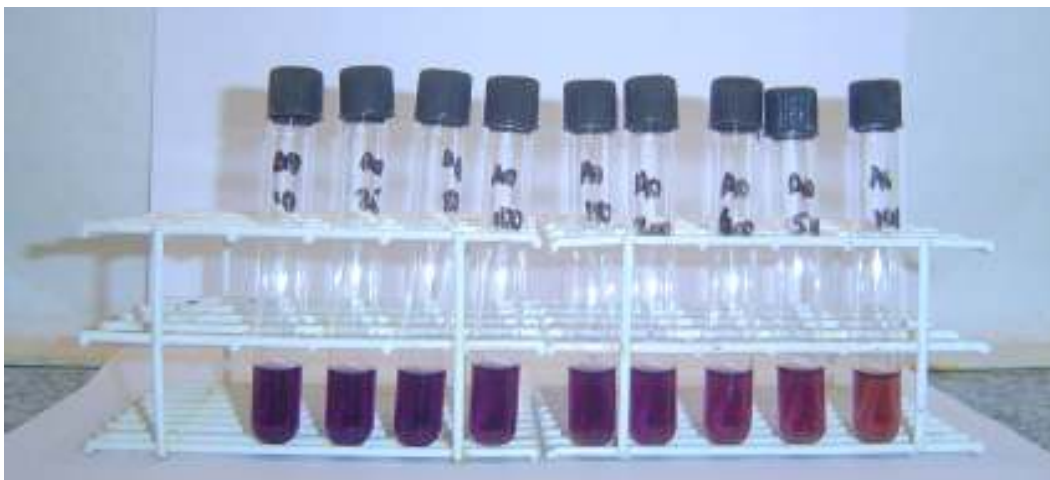


Figura 20. Análise de seqüestro de radical DPPH em vinagre de arroz da marca 5.

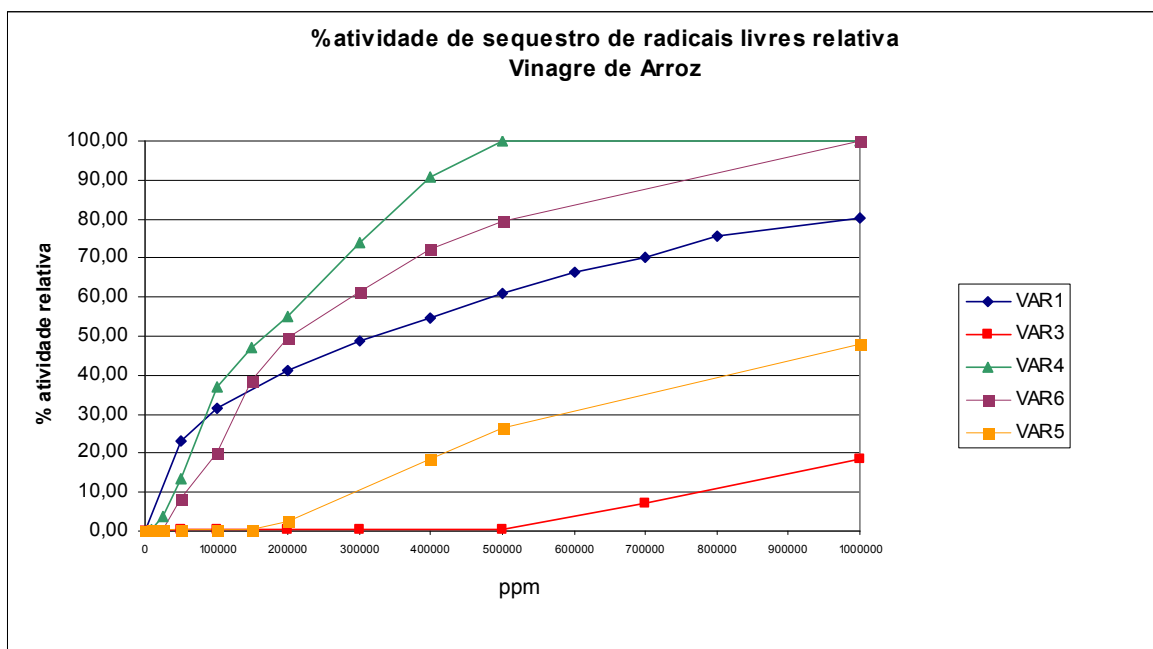


Figura 21. Análises de seqüestro de radical DPPH em vinagres de arroz.



Figura 22. Análise de seqüestro de radical DPPH em vinagre de laranja da marca 2.

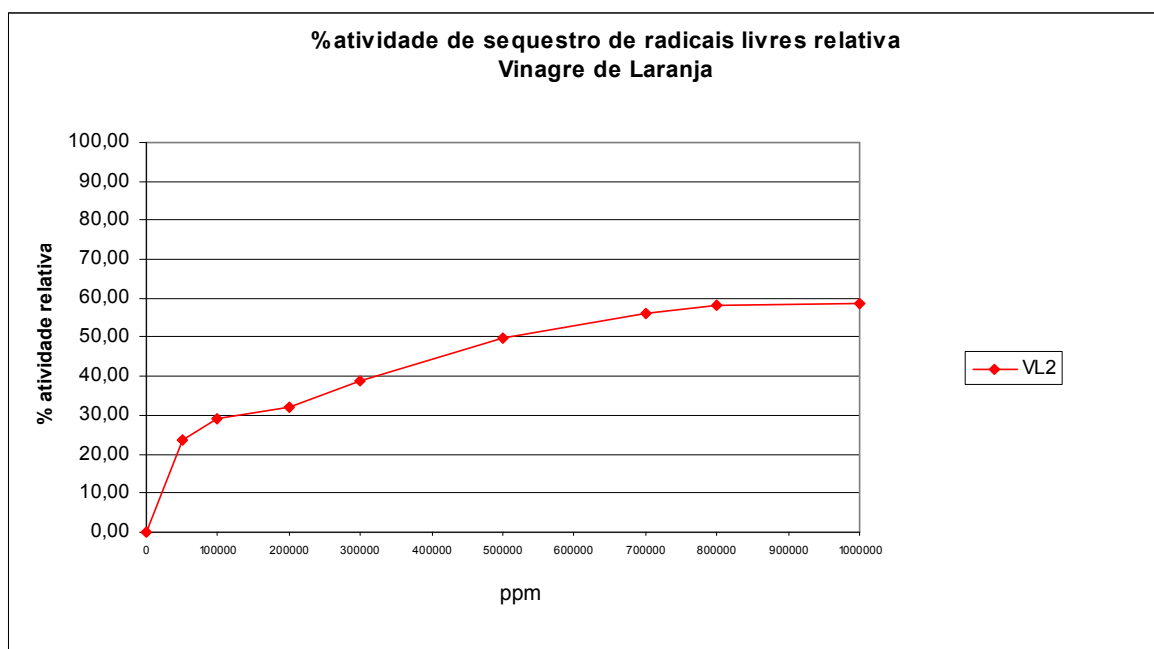


Figura 23. Análises de seqüestro de radical DPPH em vinagre de laranja da marca 2.

A Figura 24 relaciona os dados de concentração de fenóis totais e de atividade de seqüestro de radical DPPH, mostrando que estes dados podem ser correlacionados.

Em estudos comparativos entre as análises de fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu e seqüestro de radical DPPH, KATSUBE *et al.* (2004) e PAREJO *et al.* (2002 *apud* KATSUBE *et al.*, 2004) encontraram coeficientes de correlação elevados ($R=0,969$ e $R=0,70-0,83$ respectivamente). Segundo KATSUBE *et al.*, (2004), a atividade de seqüestro do radical DPPH pode ser prevista pela análise de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu, pelo fato de ambos os métodos dependerem de um mecanismo similar: a propensão de doação de hidrogênio. Como era de se esperar, os dados obtidos neste experimento também podem ser relacionados diretamente com o índice de fenóis totais encontrados nas amostras.

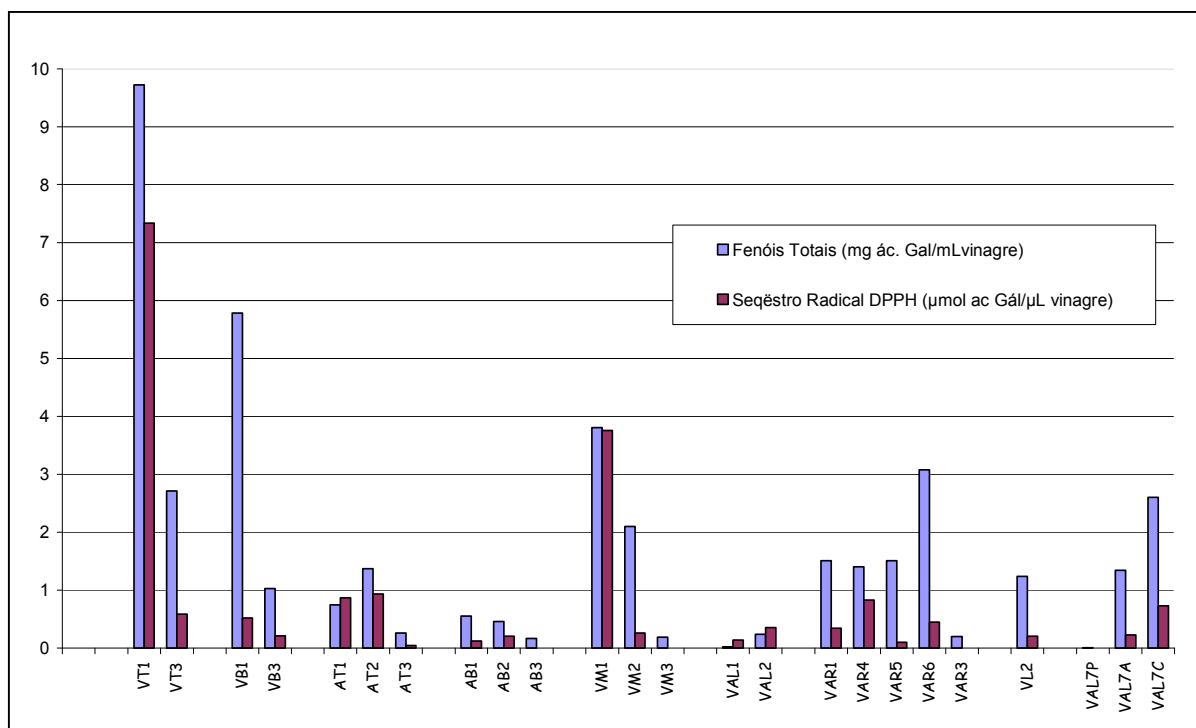


Figura 24. Resultados de índice de fenóis totais e seqüestro de radicais DPPH dos vinagres estudados.

VT: vinagre de vinho tinto; VB: vinagre de vinho branco; VAR: vinagre de arroz; VM: vinagre de maçã; VL: vinagre de laranja; AB: agrin branco (vinho branco/álcool); AT: agrin tinto (vinho tinto/álcool); VAL: vinagre de álcool. Os números que seguem a codificação indicam a marca de origem.

4.5 Vinagre de álcool envelhecido em madeira

A importância que pequenas alterações na composição fenólica têm sobre as propriedades organolépticas, faz com que os fenóis venham sendo analisados por todo o sistema de envelhecimento de madeira em vinhos. Poucos estudos trazem os efeitos desse envelhecimento para vinagre (PLESSI *et al.*, 1989; GARCIA-PARRILLA *et al.*, 1999; ALONSO, 2004).

Em função dos resultados obtidos com vinagres comerciais para os índices de antioxição e seqüestro de radicais livres, aventou-se a hipótese dos vinagres comerciais terem adição de antioxidantes como conservantes. Assim sendo, a fim de se comprovar a correlação entre índice de antioxição, concentração de fenóis e capacidade de seqüestrar radicais livres, foi realizado um experimento com vinagre de álcool não comercial, livre de qualquer aditivo.

A Tabela 8 apresenta os resultados de índice de fenóis totais, índice de antioxição e atividade seqüestrante de DPPH e concentração de ácido acético em amostras de vinagre de álcool mantidas em contato com aparas de madeira Carvalho (*Quercus rubra*), Cabriúva (*Myrcocarpus frondous*) e sem aparas por um período de 30 dias

O vinagre de álcool sem ação da madeira (VALP) mostrou pequena quantidade de fenóis totais (0,012 mg/mL), baixo índice de antioxição (1,311) e nenhuma atividade de seqüestro de radicais livres. Isso se explica pelo fato de este vinagre ser quase que somente uma solução de ácido acético (AQUARONE & ZANCANARO, 1990).

O processo de envelhecimento permite aos polifenóis, que contribuem para o poder antioxidante, passarem da madeira para os produtos envelhecidos (ALONSO *et al.*, 2004). O vinagre de álcool mantido em contato com aparas de carvalho americano mostrou um aumento em todos os parâmetros estudados durante os 20 primeiros dias, havendo depois deste período uma estabilização na transferência desses compostos da madeira para o vinagre.

Tabela 8. Resultados do índice de fenóis totais, índice de antioxição e atividade sequestrante de DPPH e concentração de ácido acético em amostras de vinagre de álcool envelhecidas em madeira Carvalho (*Q. rubra*), Cabriúva (*M. frondosa*) e sem aparas por um período de 30 dias.

Amostra	Fenóis Totais* (mg/ml)	Índice de Antioxição	Atividade sequestrante de DPPH* ($\mu\text{mol}/\mu\text{L}$)	% da atividade sequestrante do ácido gálico	Ácido acético (ppm)
VALP	0,012	1,311	0,0000	0,0000%	54958,2
VALC5	0,596	1,665	0,1111	0,0021%	53610,15
VALC10	0,836	1,878	0,1835	0,0035%	54056,8
VALC15	1,022	2,095	0,2200	0,0041%	51908,85
VALC20	1,091	2,169	0,2056	0,0039%	53675,40
VALC25	1,104	2,067	0,2005	0,0038%	55075,45
VALC30	1,178	2,110	0,2067	0,0039%	52695,05
VALB5	0,167	1,453	0,0000	0,0000%	54470,20
VALB10	1,331	2,013	0,1475	0,0028%	55552,65
VALB15	1,983	2,139	0,1847	0,0035%	55919,95
VALB20	2,150	2,351	0,2662	0,0050%	53777,55
VALB25	2,284	2,081	0,3079	0,0058%	54116,25
VALB30	2,654	2,316	0,3323	0,0063%	53567,1

* expresso em ácido gálico

VALP: vinagre de álcool puro – sem contato com madeira; VALC: vinagre de álcool em madeira carvalho; VALB: vinagre de álcool em madeira cabriúva. Os números correspondem aos dias de envelhecimento.

O vinagre mantido em contato com carvalho teve um maior acréscimo de compostos fenólicos nos cinco primeiros dias, se comparado ao mantido em contato com cabriúva. No entanto, a partir deste período, o vinagre mantido em cabriúva obteve maiores índices em todos os tempos, sem apresentar estabilização da transferência desses compostos após trinta dias.

Mais uma vez, os resultados de seqüestro de radical DPPH apresentaram relação direta com o conteúdo de fenóis totais, demonstrando a importância desses compostos na atividade seqüestrante de radicais livres. Pôde-se estabelecer com segurança a relação da atividade antioxidante com o conteúdo de fenóis totais, uma vez que as amostras utilizadas não continham nenhum tipo de aditivo antioxidante com esta finalidade.

Os dados contidos no gráfico da figura 25 mostram que pode haver uma correlação entre o conteúdo fenóis totais, índice antioxidante e seqüestro de radical DPPH. Em seu estudo com vinagres envelhecidos em barris de madeira, ALONSO *et al.* (2004) concluíram que o poder antioxidante está intimamente relacionado com o conteúdo de polifenóis totais das amostras. Outro estudo, realizado por KATSUBE *et al.* (2004) correlacionou também o conteúdo de fenóis totais com o seqüestro de radical DPPH.

Se compararmos a ação dos dois tipos de madeira utilizados, veremos que a cabriúva apresentou vantagens em relação ao carvalho americano, com maior transferência de compostos de ação funcional. Soma-se a esse dado, o fato de a cabriúva ser mais acessível e de menor custo, sendo então mais indicada para esse fim.

A maior concentração de fenóis totais obtido nesse experimento (2,654mg/mL), foi superior ao observado nas amostras de *Agrin* tinto das marcas 1 e 2 (0,747 e 1,369mg/mL, respectivamente). No entanto, a atividade de seqüestro de radical DPPH foi bem inferior: 0,0063% contra 0,016% e 0,018%. Esses dados mostram que os compostos fenólicos presentes na uva podem possuir maior potencial seqüestrante do que os presentes nos tipos de madeira estudados.

O único ácido orgânico encontrado foi o ácido acético em todas as amostras, não havendo adição de nenhum dos ácidos orgânicos, bem como qualquer alteração, significativa na concentração do ácido acético nos processos de envelhecimento estudados.

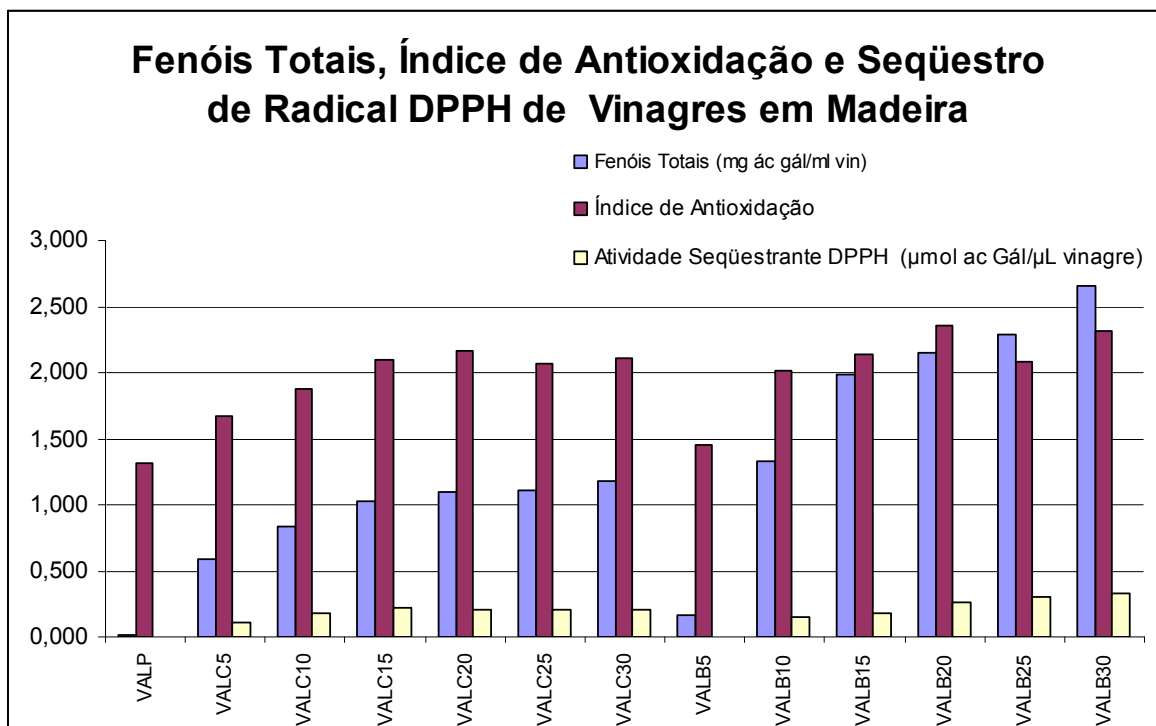


Figura 25. Resultados das análises de fenóis totais, índice antioxidante e seqüestro de radical DPPH em vinagres de álcool envelhecidos com madeira.

VALP: vinagre de álcool puro – sem contato com madeira; VALC: vinagre de álcool em madeira carvalho; VALB: vinagre de álcool em madeira cabriúva. Os números correspondem aos dias de envelhecimento.

5. CONCLUSÕES

Muito embora o objetivo proposto neste trabalho não fosse o desenvolvimento de metodologia analítica para atestado de origem ou qualidade do produto final, identificou-se uma oportunidade importante com os resultados obtidos através das análises de ácidos orgânicos, fenóis totais, índice de antioxição, seqüestro de radicais livres e suas correlações.

A quantificação e identificação dos ácidos orgânicos nas amostras analisadas evidenciaram a relação entre os tipos de ácidos orgânicos presentes com a matéria-prima fermentada. Enquanto os vinagres de álcool possuem apenas o ácido acético, os vinagres de outras categorias apresentaram grande variação no conteúdo de ácidos orgânicos, sendo alguns ácidos, característicos de determinadas matérias-primas. Os ácidos tartárico, málico/lático e succínico se mostraram compostos característicos de vinagres de vinhos tinto e branco. As amostras de vinagre de arroz foram as únicas que apresentaram ácido butírico.

Os resultados obtidos na determinação do índice de antioxição apresentaram uma grande variação, mesmo dentro das categorias. Esses resultados não podem ser diretamente relacionados à matéria-prima fermentada, uma vez que podem ser utilizados aditivos com poder antioxidante nesses produtos.

A maior concentração de fenóis totais foi encontrada no vinagre balsâmico estudado, seguido dos vinagres de vinho tinto e branco, estreitando a relação desses componentes com a uva, utilizada como matéria-prima desses produtos. Os vinagres de álcool ou com adição deste, mostraram os menores índices destes compostos.

O conteúdo de fenóis totais se relaciona diretamente com a atividade seqüestrante do radical DPPH.

O processo de envelhecimento das amostras de vinagre, em contato com aparas de carvalho e cabriúva aumentou o conteúdo fenólico, o poder antioxidante e a atividade sequestrante de radical DPPH de vinagres de álcool.

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que as amostras de vinagre estudadas apresentaram alta variação na composição, mesmo quando se tratava da mesma categoria, indicando a falta de padronização e fiscalização deste produto no país.

Frente à necessidade da utilização de métodos analíticos rápidos e confiáveis para um controle de qualidade do vinagre, este trabalho mostra que é possível, por meio de análises laboratoriais simples e acessíveis, obter indícios de adulteração e utilização de matérias-primas de baixa qualidade.

Serão necessários estudos específicos a fim de identificar as moléculas de polifenóis presentes, responsáveis pela ação antioxidante e de sequestro de radicais livres, bem como estudos para evidenciar a ação protetora em células.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACNielsen Data Presented at 2003 VI Annual Meeting. Base de Dados. Disponível em : TheVinegarInstitute.htm . Acesso em: 04 de Abril 2005.

ADAMS, M.R. Vinegar. In: WOOD, B.J.B. **Microbiology of fermented foods**. London: Elsevier Applied Science, 1998. v. 1, p. 1-44.

ALONSO, A.M.; CASTRO, R.; RODRIGUEZ,M.C.;GUILLEN, D.A.; BARROSO,C.G. Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from Sherry wines and correlation with their content in polyphenols. **Food Research international** 37, 2004, pp 715-721.

ANTONELLI, A., ZEPPA, G.,GERBI, V., CARNACINI,A. Polyalcohols in vinegar as na origin discriminator. **Food Chemistry**, vol 60 no 3, 403-407, 1997.

AQUARONE, E.; ZANCANARO JR., O. Vinagres. In: AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. (ed.). **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher, 1990. p.105-123.

ARAÚJO, J.M. **Química de Alimentos – Teoria e Prática**. Editora UFV Universidade Federal de Viçosa, 2 edição – 2001.

ARTS, I.C.W.; VAN DE PUTTE, B.; HOLLMAN, P.C.H. Catechin Contents of Foods Commonly Consumed in The Netherlands. 2. Tea, Wine, Fruit Juices, and Chocolate Milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2000; 48:1752-57.

ARUOMA, O.I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. **Fd Chem Toxic**. Vol 32, n 7, pp 671-683, 1994.

ASAI, T. **Acetic acid bacteria classification and biochemical activities**. Tokyo: University of Tokyo, 1968. 343 p.

BEATTI, D.S. Bioenergética e Metabolismo Oxidativo In: DELVIN, T.M. (Coord.) **Manual de Bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda 1ª Ed., 2003.

BERTOLINI, L; CASTAGNETTI, G.B.; GAMBINI, G. Estimation of organic acids in vinegars by high performance liquid chromatography. **Industrie delle bevande**, 1994 23: 132, 324-326.

BILSKA, V. Plasmid Systems in Acid Bacteria of Genus *Acetobacter*. **Biologia** - (Bratislava). 2003; 58(3): 321-326.

BORAZJANI, A.; ANDREWS, L.; VEAL, C.D. Novel nonthermal methods to reduce vibrio vulnificus in raw oysters. **Journal of Food Safety**. 2003; 23(3): 179-187

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº 04 de 05 de fevereiro de 2001**. Brasília: MAA, 2001.

CHEUNG, P.Y.; WANG, W.; SCHULZ, R. Glutathione Protects Against Myocardial Ischemia-reperfusion Injury by Detoxifying Peroxynitrite. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** vol. 32, n 9, 1669-1678, 2000.

CHINNAWIROTPISAN, P.; THEERAGOOL, G.; LIMTONG, S.; TOYAMA, H.; ADACHI, O.; MATSUSHITA, K. Quinoprotein Alcohol Dehydrogenase Is Involved in Catabolic Acetate Production, while DAD-Dependent Alcohol Dehydrogenase in Ethanol Assimilation in *Acetobacter pasteurianus* SKU1108. **Journal of Bioscience and Bioengineering** vol. 96, n 6, 564-571, 2003.

COCCHI, M.; LAMBERTINI, P.; MANZINI, D.; MARCHETTI, A.; ULRICI, A. Determination of Carboxylic acids in vinegar and in Aceto Balsâmico Tradizionale di Modena by HPLC and GC methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2002; 50(19): 5255-5261.

COOPER, K.A.; THURNHAM, D.I. Wine polyphenols and promotion of cardiac health. **Nutrition Research Reviews**. 17 (1): 111-129, June, 2004.

CARLUCCIO, M.A.; SICULELLA, L.; ANCORA, M.A.; MASSARO, M.; SCODITTI, E.; Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation **Arteriosclerosis, Thrombosis Vascular Biology**. 2003; 23:622-29.

COSTA, R.P.; SILVA, C.C.; PIMENTEL, I.C. Hábito alimentar e dislipidemias-Fundamentos para orientação dietética. In: XAVIER, H.T. (Org.) **Manual de dislipidemias e cardiometabolismo**. São Paulo: BBS editora, 2004.

DA LUZ, P. L. ; YOSHIDA, V. M. ; CHACRA, A. P. ; FURTADO, M. ; GUTIERREZ, P. The effect of red wine on experimental atherosclerosis extension: lipid independent protection.. **Experimental And Molecular Pathology**, v. 65, p. 150-159, 1999.

DE LEY, J.; GILLIS, M.; SWINGS, J. Family VI. *Acetobacteraceae*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. v. 1, p.267-277, 1984.

DÍAZ, J.M., **Práticas de enología aplicadas a la enseñanza de la química em el bachillerato**. Departamento de Física y Química I.E.S “Valdehiero”, 1999. Base de dados disponível em centros5.pntic.mec.es. Acesso em: 04 de abril 2005.

DZIEDZIC, S.Z.; HUDSON, B.J.F. phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. **Food Chemistry, Oxford**, v 14, p 45-51, 1984.

EBNER, H.; FOLLMANN, H.; SELLMER, S. In: **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. VCH Verlagsgesellschaft, 1996, Vol A27, Germany.

EBNER, H. In: **Industrial Microbiology**. Ed. Gerald Reed, 1983, pp 802-834.

FINLEY, J.W. Phenolic Antioxidants and Prevention of Chronic Inflammation. **Food Technology Feature**, vol 58, n 11: 42-46, 2004.

FREI, B. **Molecular and biological mechanisms of antioxidants action**. FASEB, 1999; 13: 963-964.

FRINGS MICRODYN DO BRASIL. **Arquivos técnicos em fermentação submersa**. Piracicaba, 1996. (mimeogr.).

GALIZIA, M.S.; WAITZBERG, D.L. Mecanismo de ação dos radicais livres e antioxidantes. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica** 2001; 16:79-89.

GARCIA-PARRILLA, M.C.; HEREDIA, F.J., TRONCOSO, A.M. Phenolic composition of wine vinegars produced by traditional static methods. **Nahrung** 41 (4): 232-235, 1997.

GARCIA-PARRILLA, M.C.; HEREDIA, F.J., TRONCOSO, A.M. Sherry wine vinegars: phenolic composition changes during aging. **Food Research International**, 1999; 32: 433-440.

GARCIA-PARRILLA, M.C.; LEON-CAMACHO, M.; HEREDIA, F.J.; TRONCOSO, A.M. Separation and identification of phenolic acids in wine vinegars by HPLC. **Food Chemistry**. 1994; 50 (3): 313-315.

GEUM-SOON-OH; KIL-JIN-KANG; YEONG-PYO-HONG; YEOUNG-SUN-AN; HYANG-MI-LEE. Distribution of organic acids in traditional and modified fermented

foods. **Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition**. 2003; 32(8): 1177-1185.

HAMMERSCHMIDT, P.A.; PRATT D.E.. Phenolic antioxidants of dried soybeans. **Journal of Food Science**, 1978, 43, 556-559.

HERTOG, M.G.L.; FESKENS, E.J.M.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B.; KROMHOUT, D. **Dietary antioxidants flavonoids and risk for coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study**. Lancet 1993; 342:1007-11.

KATSUBE, T.; TABATA, H., OHTA, Y.; YAMASAKI, Y.; ANURAD, E.; SHIWAKU, K.; YAMANE, Y. Screening for antioxidant in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2004, 52, 2391-2396

LANKAPUTHRA, W.E.V.; SHAH, N.P. Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids. **Mutation Research**, 1998, 397, 169-182.

LARSON, E.R.N.; DUARTE, G.M.D. Home Hygiene Practices and Infectious Disease Symptoms Among Household Members. **Public Health Nursing**. 18 (2): 116-127, March/April 2001.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Brock: **Biología de los microorganismos**. 8.ed. Madrid: Prentice Hall Iberia, 1997.

MIYAKAMA, Y; MIYAGAWA, F., NISHIYAMA, Y., MURA, K., TOKUE, C. Antioxidative smoke flavor extraction in wood vinegar prepared from drift wood. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**. 2003; 50 (11): 530-536.

MORALES, M. L.; GONZÁLES, G.A.; CASAS, J.A.; TRONCOSO, A.M. Multivariate analysis of commercial and laboratory produced Sherry wine vinegars: influence of

acetification and aging. **European Food Research and Technology**. 2001; 212(6): 676-682.

MORALES, M.L.; GONZALEZ G.A.; TRONCOSO, A.M., Íon-exclusion chromatographic determinaton of organic acids in vinegars. **Journal of Chromatographic A**, 822, 1998, 45-51.

MORETTO, E.; ALVES, R.F.; CAMPOS, C.M.T.; ARCHER, R.M.B.; PRUDENCIO, A. **Vinhos e vinagres: processamento e análises**. Florianópolis: Ed. UFSC, 1988. 168 p.

NATERA, R.;CASTRO,R., GARCIA-MORENO,M.V.;HERNÁNDEZ, M.J.; GARCIA-BARROSO,C. Chemometric Studies of Vinegar from Different Raw Materials and Processes of Production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 2003, 51, 3345-3351.

NISHIDAI, S.; NAKAMURA, Y.; TORIKAI, K.; YAMAMOTO, M.; ISHIHARA,N.; MORI, H.; OHIGASHI,H. Kurosu, a traditional vinegar produced from unpolished rice, suppresses lipid peroxidation in vitro and in mouse skin. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry (Japan)**. 2000, v 64(9) 1909-1914.

OGAWA, N.; SATSU, H.; WATANABE, H.; FUKAYA, M.; TSUKAMOTO,Y.; MIYAMOTO, Y.; SHIMIZU, M. Acetic acid suppresses the increase in disaccharidade activity that occurs during culture of caco-2 cells. **J-Nutr**. Mar, 2000; 130(3) 507-513.

PARK, Y.K.; IKEGAKI,M.; ABREU, J.A.S.; ALCICLN, M..F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 18 (3): 313-318, ago.-out. 1998.

PIVETTA, M. A receita do doutor Baco – Estudos sugerem que compostos do vinho tino aumentam a logevidade. **Ciência e Tecnologia no Brasil – Pesquisa FAPESP**. nº 18 pp 44-47, junho, 2005.

PLESSI, M.; MONZANI, A.; COPPINI, D. Quantitative determination of acids and derivatives in balsamic and other vinegars. **Sciences des Aliments**, 9: 179-183, 1989.

PRATT, D.E.; BIRAC, P.M. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. **Journal of food science**, v.44, 1979, pp1720-1723.

PRATT, D.E.; WATTS, B.M. The antioxidant activity of vegetable extracts. **Journal of food science**, v.29. p. 27-31, 1964.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Struture-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radc Biol Med** 1996;20:933-956.

RIZZON, L.A.; MIELE, A. Concentração de ácido tartárico dos vinhos da serra gaúcha. **Cienc Rural** vol 31 no 5 Santa Maria Sept/Oct. 2001.

RUTALA, W.A.; BARBEE, S.L.;AGUIAR, N.C.; SOBSEY, M.D.,WEBER, D.J.Antimicrobial Activity of Home Desinfectants and Natural Products Againts Potencial Human Pathogens. **Infection Cantrol & Hospital Epidemiology**. 21 (1): 33-38, January, 2000.

SAAD-HOSNE, R., **Efeito histolítico de injeção de solução bicarbonatada de ácido acetilsalicílico e da solução aquosa de ácido acético em fígado de coelhos normais, em protadores de carcinoma VX-2 e citolítico *in vitro***. Botucatu, 2001, 216p. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista”Júlio de Mesquita Filho”.

SAAD-HOSSNE, R., **Efeitos da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre a celularidade no líquido ascítico do tumor de Ehrlich em camundongo**. Botucatu, 1997, 114p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista”Júlio de Mesquita Filho”.

SAIDI, B.; AZMEH, F.; MAMLUK, O.F.; SIKORA, R.A. Effect of seed treatment with organic acids on the control of common bunt (*Tilletia tritici* and *T. laevis*) in wheat. **Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent**. 2001; 61(2A): 213-221.

SANARICO, D.; MOTTA, S.; BERTOLINI, L.; ANTONELLI, A. HPLC Determination of organic acids in Traditional Balsamic Vinegar of Reggio Emilia. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**. 2003; 26(13): 2177-2187.

SHIMOJI, Y.; TAMURA, Y.; NAKAMURA, Y.; NANDA, K.; NISHIDAI, S.; NISHIKAWA, Y.; ISHIHARA, N.; UENAKAI, K.; OHIGASHI, H., Isolation and identification of DPPH Radical Scavenging Compounds in Kurosu (Japanese Unpolished Rice Vinegar), **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 2002, 50, 6501-6503.

SILVA, J.A.; SOARES, L. F.; COSTA, E.L., Sanitização de Carcaças de Frango com Soluções de Ácidos Orgânicos Comerciais e Suco de Limão, **Revista TeC Carnes**, 2001, vol 3 n.1, 19-26, Campinas,SP.

SINGLETON, V.L.; TIMBERLAKE, C.F.; LEA, A.G.H. The phenolic of white grapes and wine. **J. Sci. Fd Agric**. 1978, 29, 403-410.

SOARES, S.E., Ácidos fenólicos como antioxidantes, **Revista de Nutrição**, 2002, v15 n1, Campinas,SP.

SPINOSA, W.A. **Isolamento, seleção, identificação e parâmetros cinéticos de bactérias acéticas provenientes de indústrias de vinagre**. Campinas, 2002. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas.

SPINOSA, W.A. **Utilização do amido da quirera de arroz na produção de vinagre. Londrina**, 1996. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina.

SWINGS, J. The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER K.-H. (Ed.). **The Prokaryotes. New York: Springer Verlag**, 1992. p. 2.268-2.286.

THOMAS, J.A. Estresse oxidativo e defesa contra oxidantes. In: SHILS, M.E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M.; ROSS, A.C. **Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença**. 9 ed. São Paulo: Ed. Manole. 2003; p801-812.

VOGEL, R.A.; CORRETTI, M.C.; PLOTNICK, G.D. The postprandial effect of components of the Mediterranean diet on endothelial function. **Journal of the American College of Cardiology**. 2000; 36(5): 1455-1460.

YAMAJI, K.; NAGANO, M.; MARUYAMA, I. Radical scavenging activity of kurozu (brewed rice vinegar) on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl and its antioxidant effect on human low-density lipoprotein. **Journal of Society of Nutrition and Food Science (Japan)** Apr, 2001; v 54(2) 89-93.

YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAOKA, J. HPLC Method for the Free Radical-scavenging Activity of Foods by Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry (Japan)**, 62 (6), 1201-1204, 1998.

ZANCANARO JR., O. **Otimização do processo lento de fermentação acética**. São Paulo, 1988. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

7 ANEXO

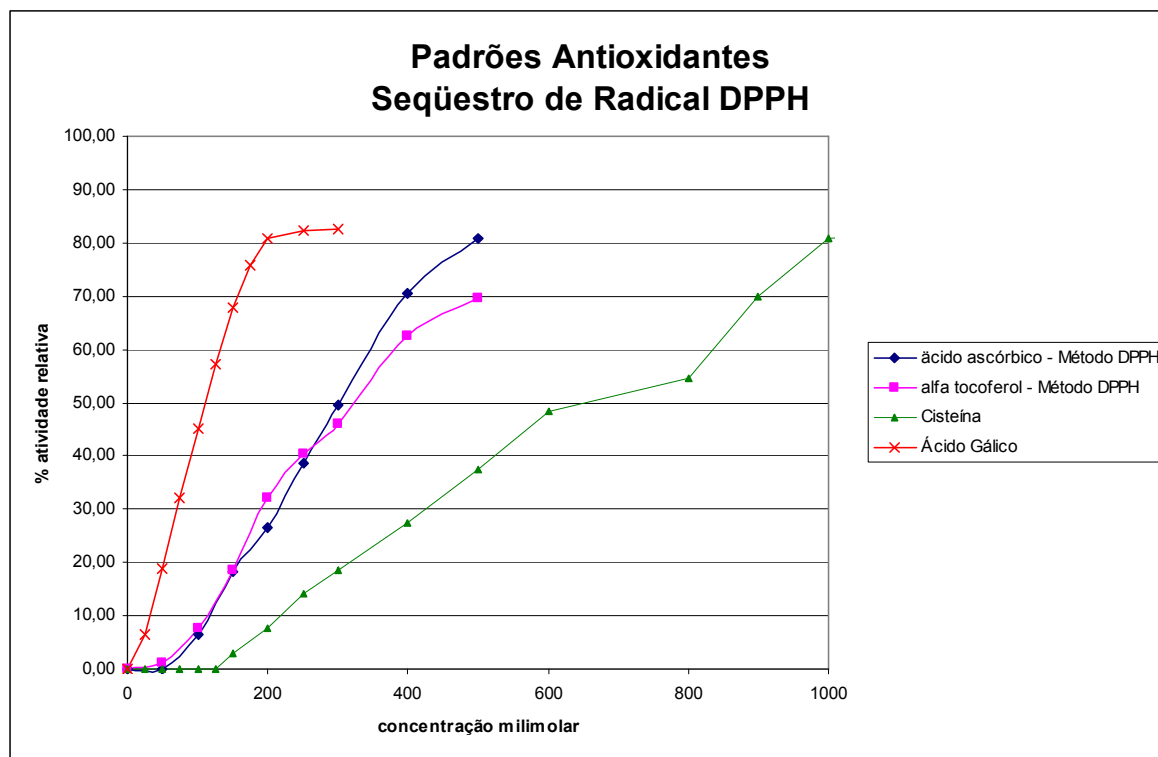


Figura A1. Atividade de Seqüestro de Radicais DPPH dos antioxidantes Ácido Ascórbico, Ácido Gálico, Alfa-Tocoferol e Cisteína.

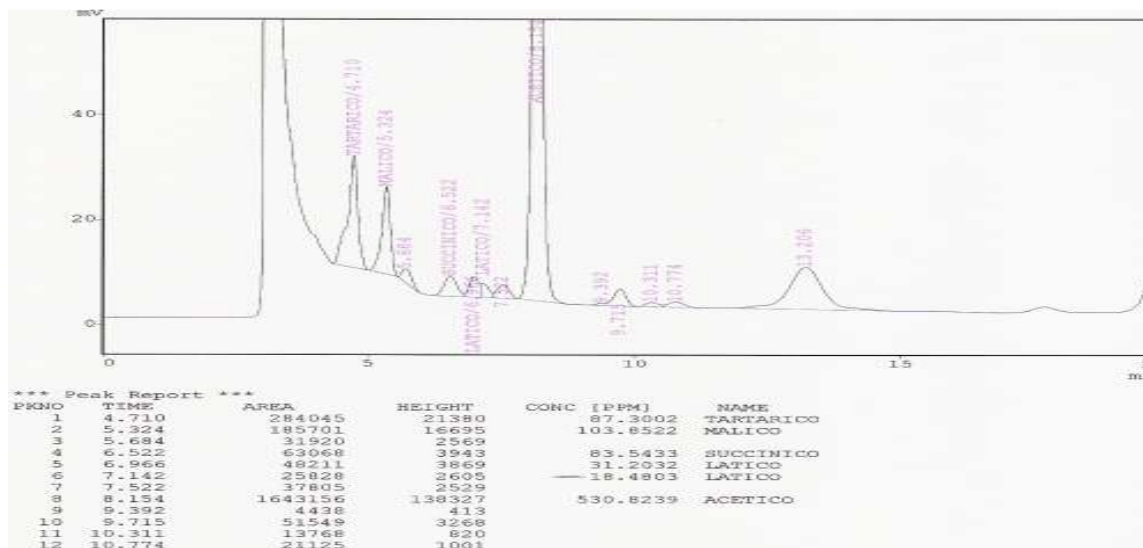


Figura A2. Quantificação cromatográfica de ácidos orgânicos do vinagre Balsâmico da empresa 1.

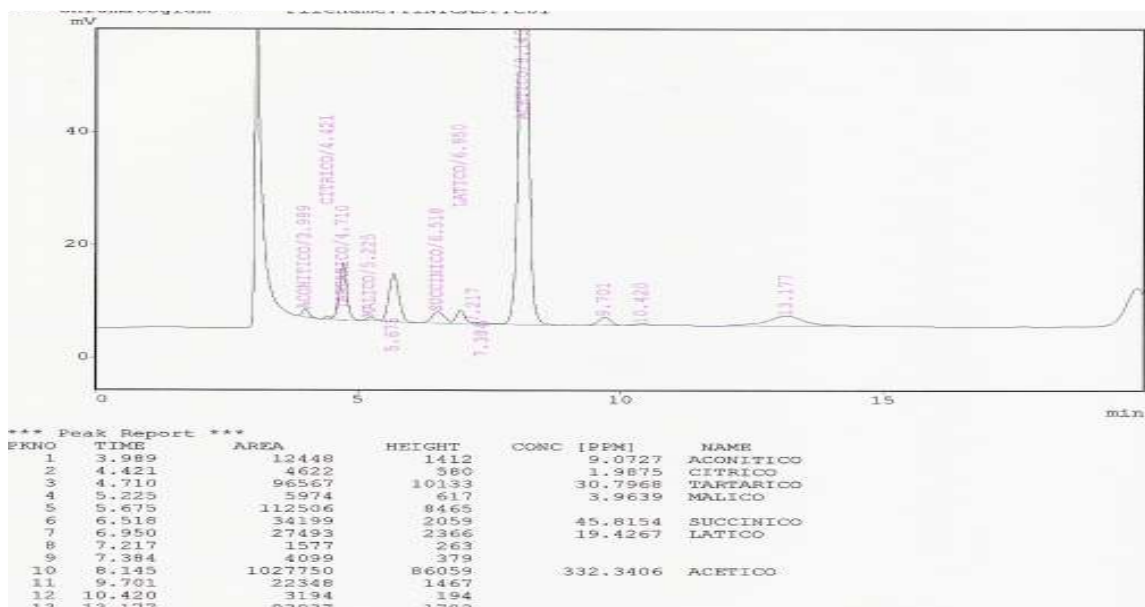


Figura A3. Quantificação cromatográfica de ácidos orgânicos do vinagre de vinho tinto da empresa 1.

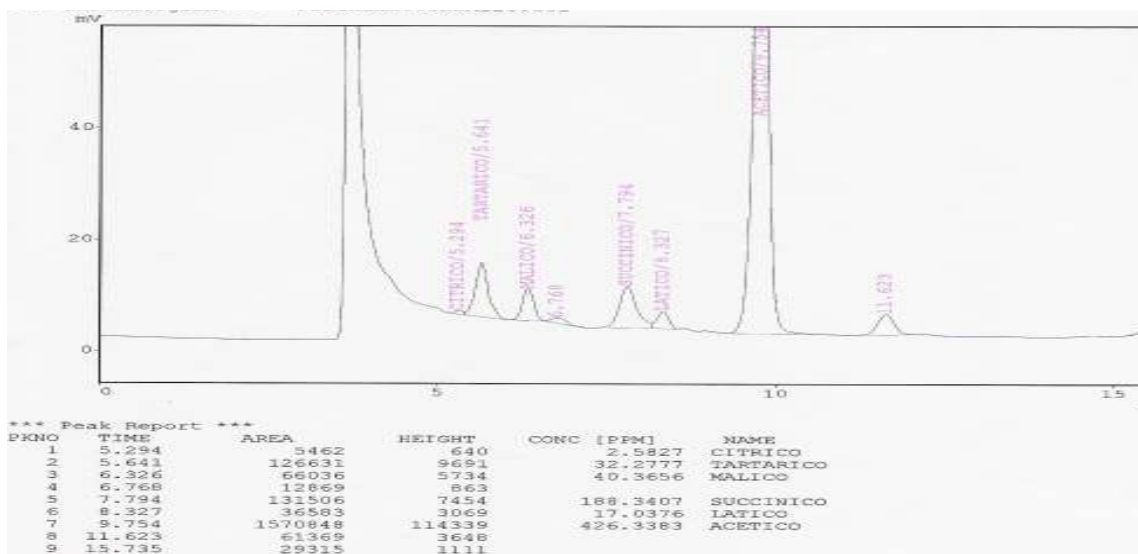


Figura A4. Quantificação cromatográfica de ácidos orgânicos do vinagre de vinho tinto da empresa 2.

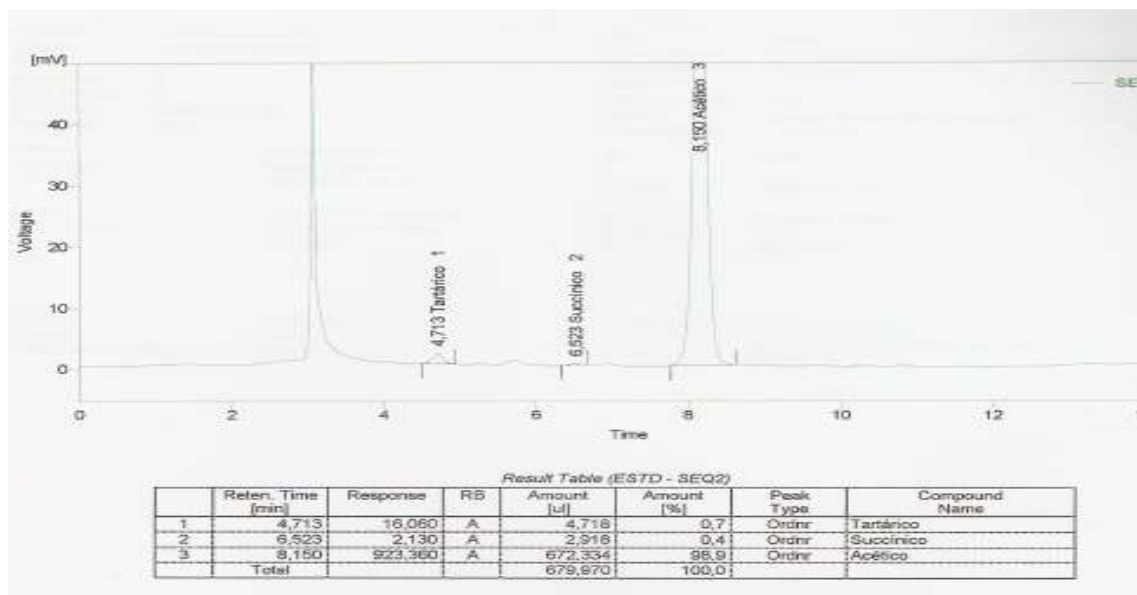


Figura A5. Quantificação cromatográfica de ácidos orgânicos do vinagre de vinho tinto da empresa 3.

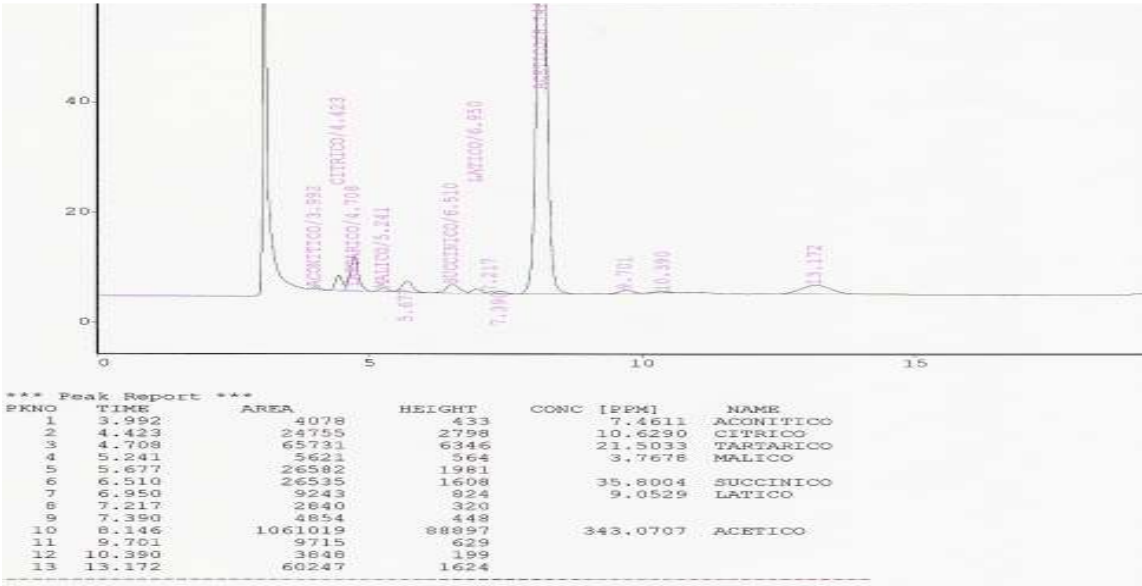


Figura A6. Quantificação cromatográfica de ácidos orgânicos do vinagre de vinho branco da empresa 1.

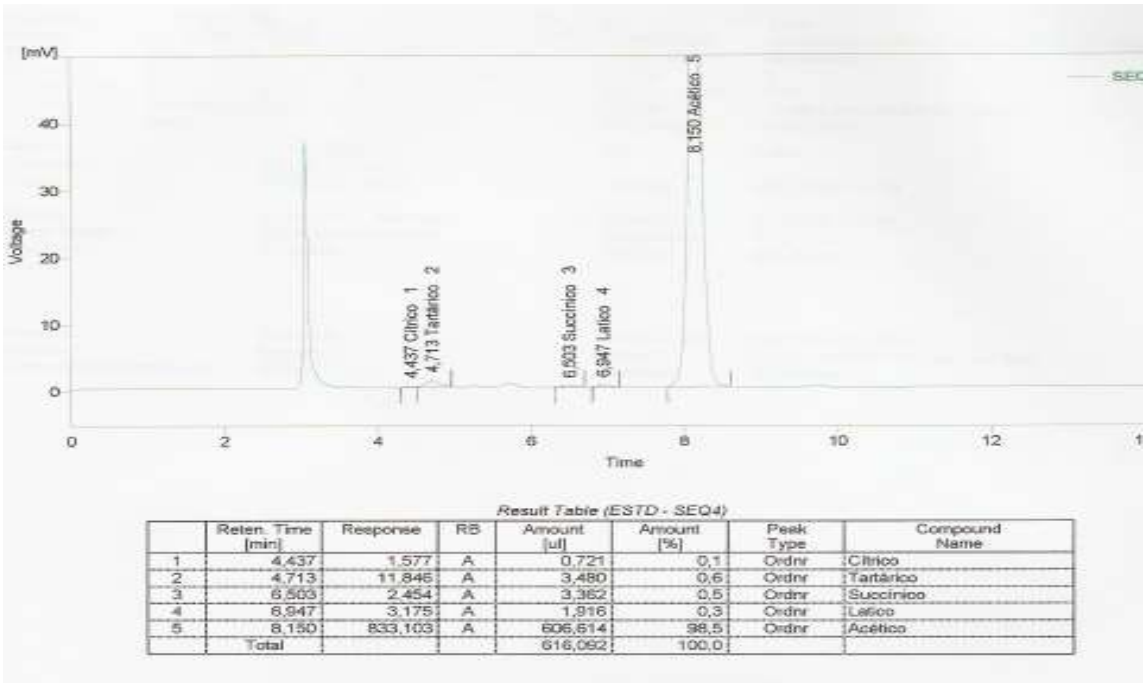


Figura A7. Quantificação cromatográfica de ácidos orgânicos do vinagre de vinho branco da empresa 3.

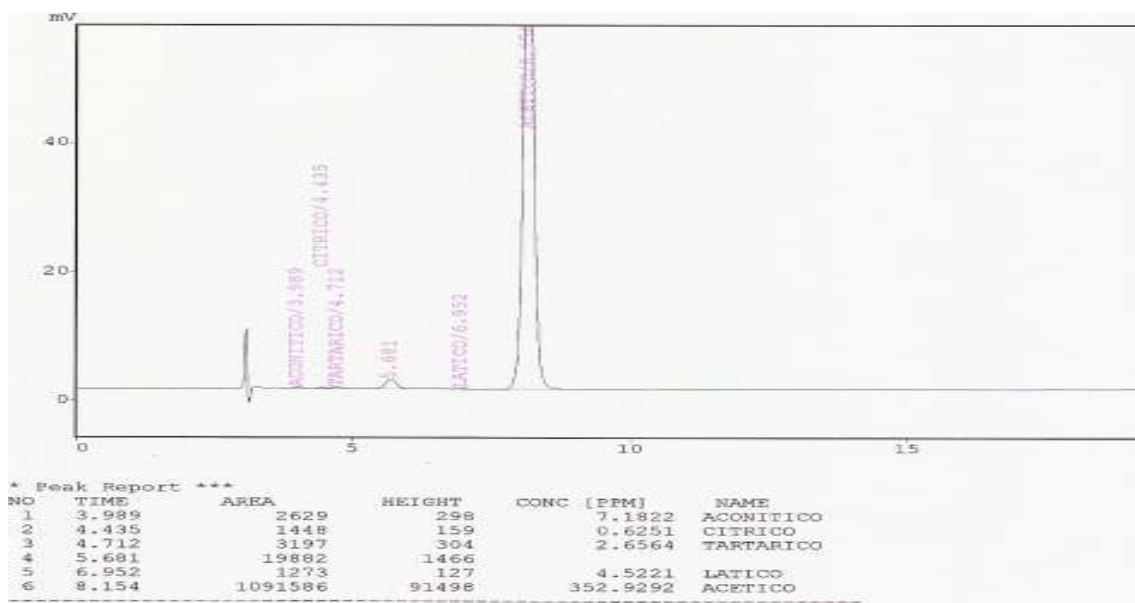


Figura A8. Quantificação cromatográfica de ácidos orgânicos do *Agrin* branco da empresa 1.

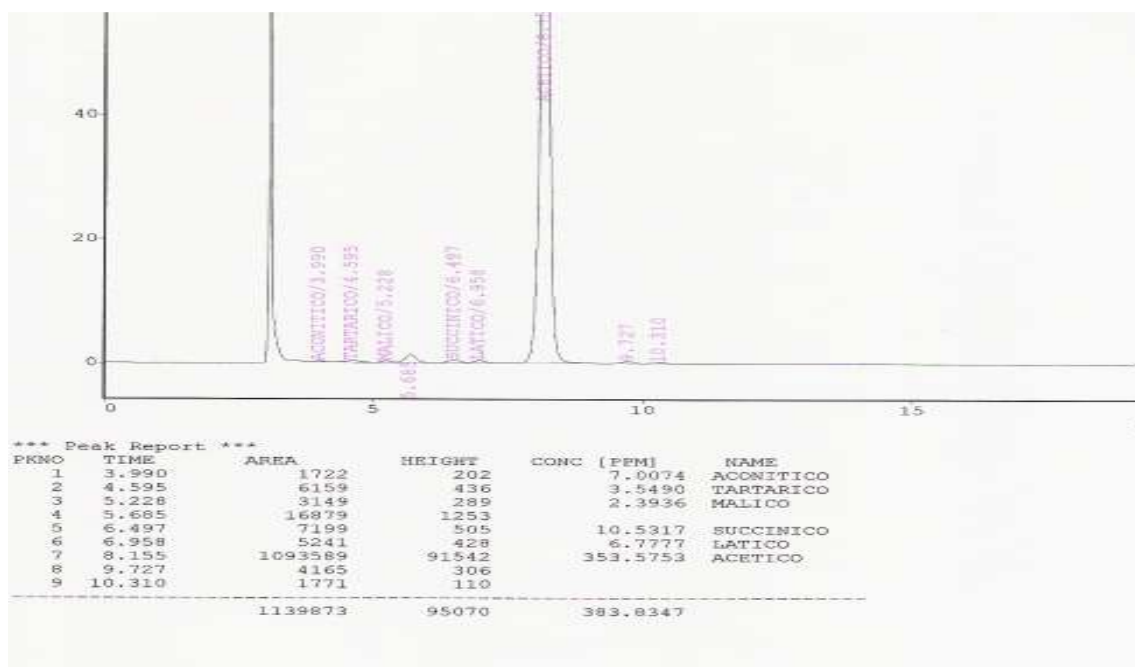


Figura A9. Quantificação cromatográfica de ácidos orgânicos do *Agrin* branco da empresa 2.

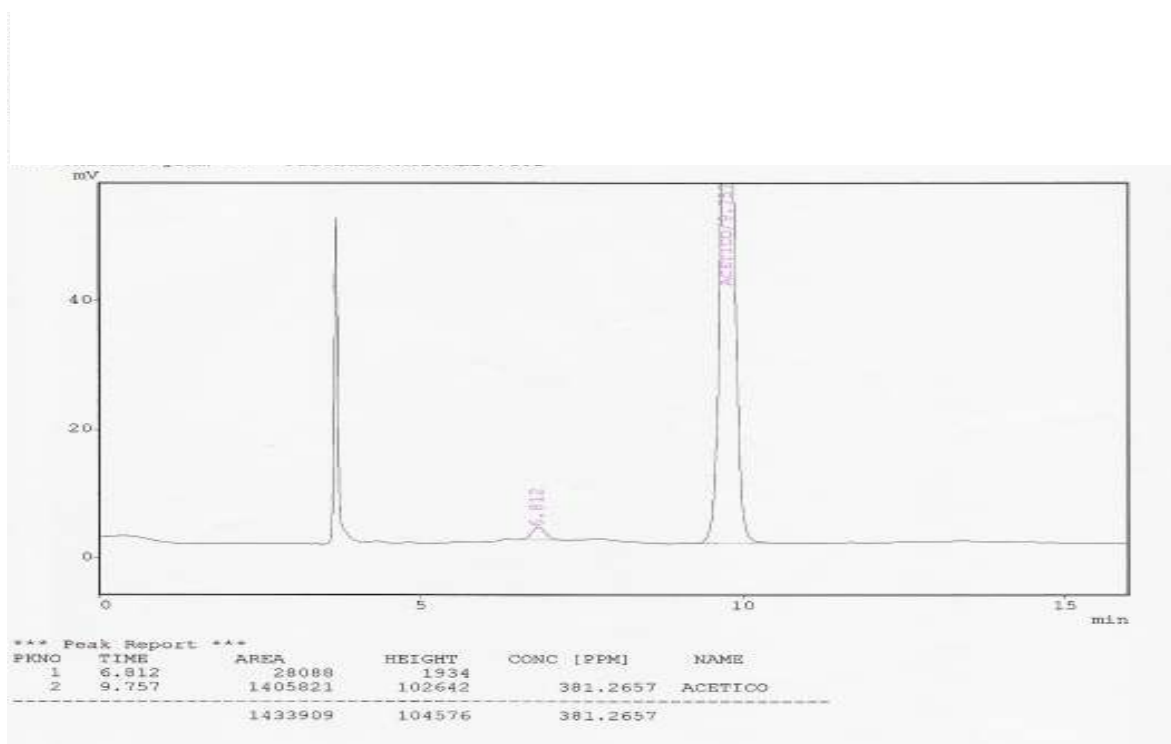


Figura A10. Quantificação cromatográfica de ácidos orgânicos do *Agrin* branco da empresa 3.

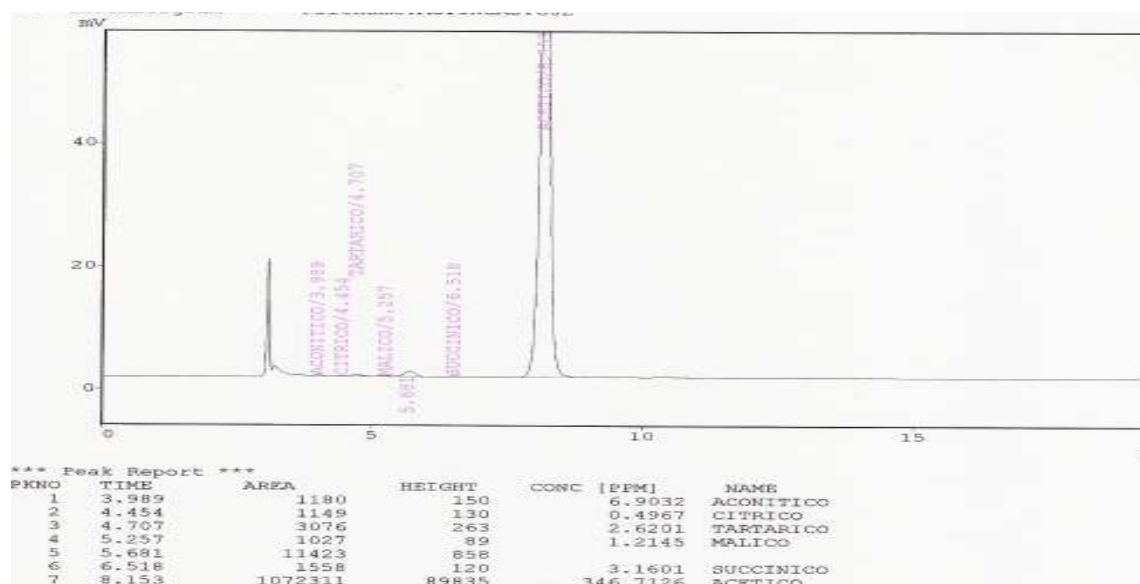


Figura A11. Quantificação cromatográfica de ácidos orgânicos do *Agrin* tinto da empresa 1.

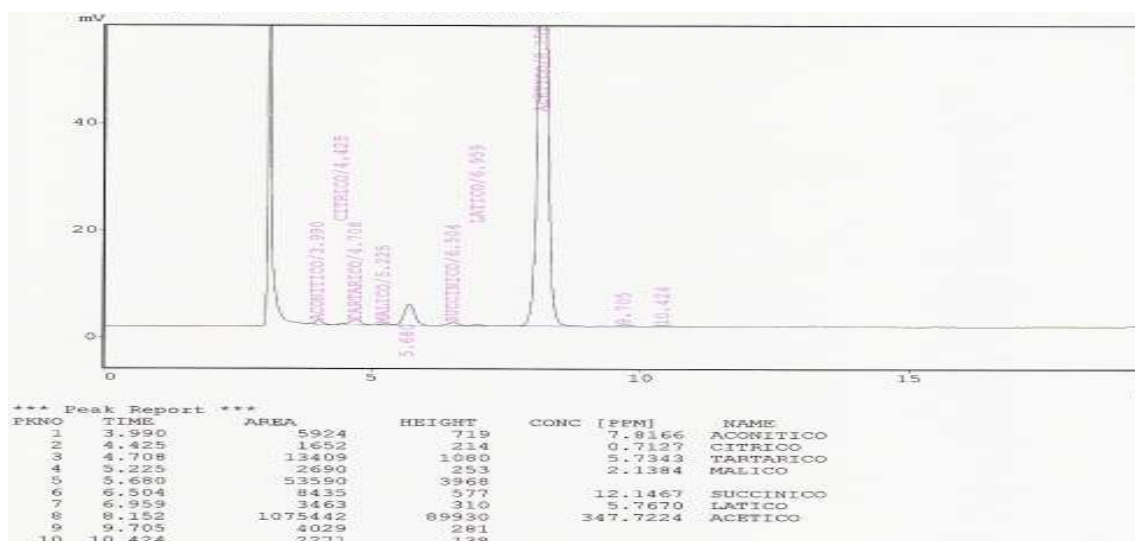


Figura A12. Quantificação cromatográfica de ácidos orgânicos do *Agrin* tinto da empresa 2.

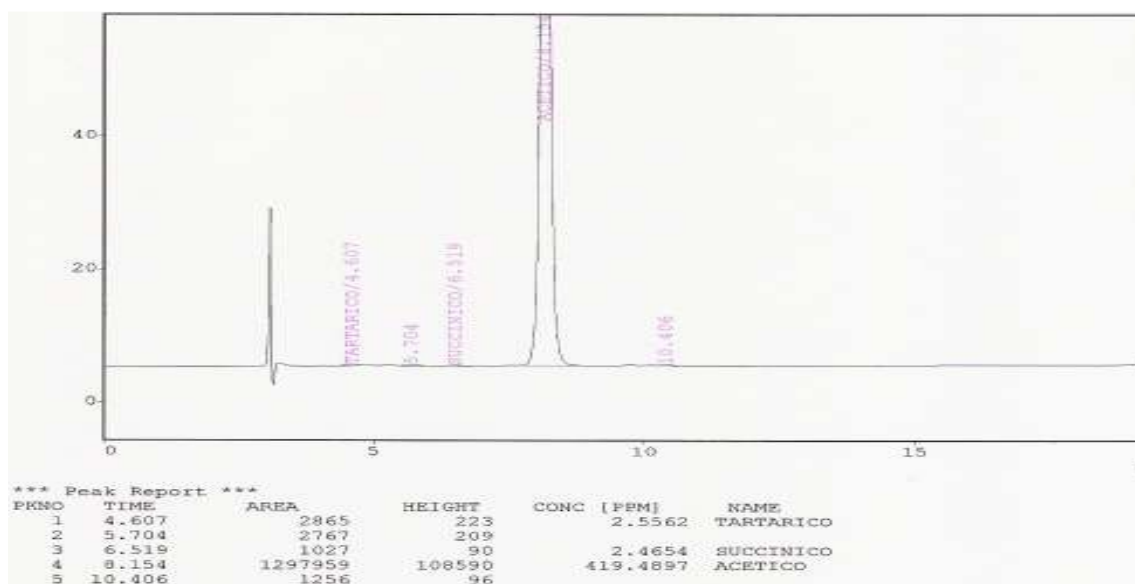


Figura A13. Quantificação cromatográfica de ácidos orgânicos do *Agrin* tinto da empresa 3.

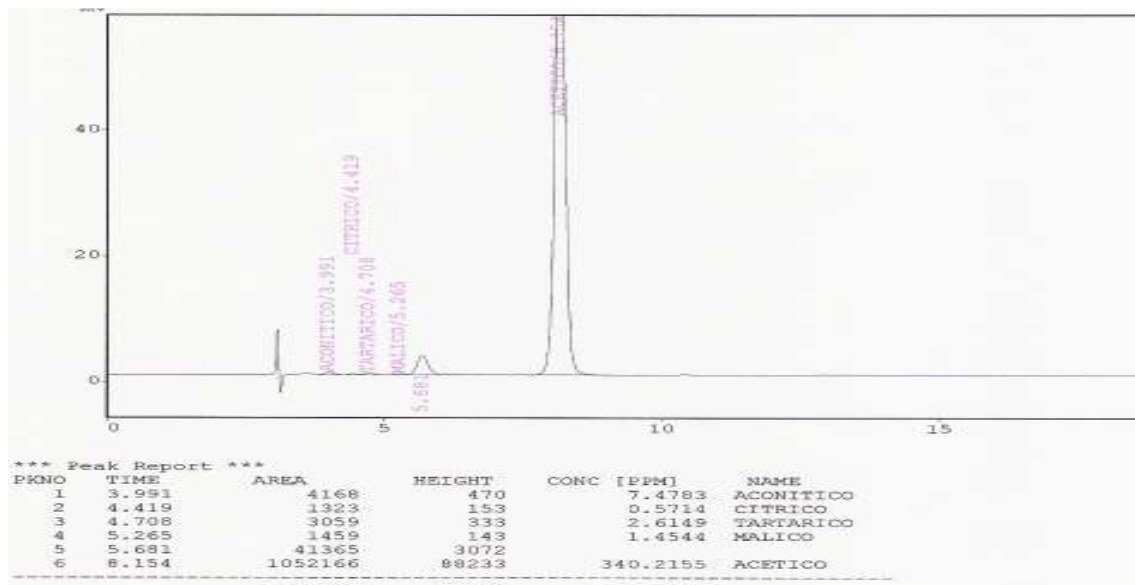


Figura A14. Quantificação cromatográfica de ácidos orgânicos do Vinagre de álcool da empresa 1.

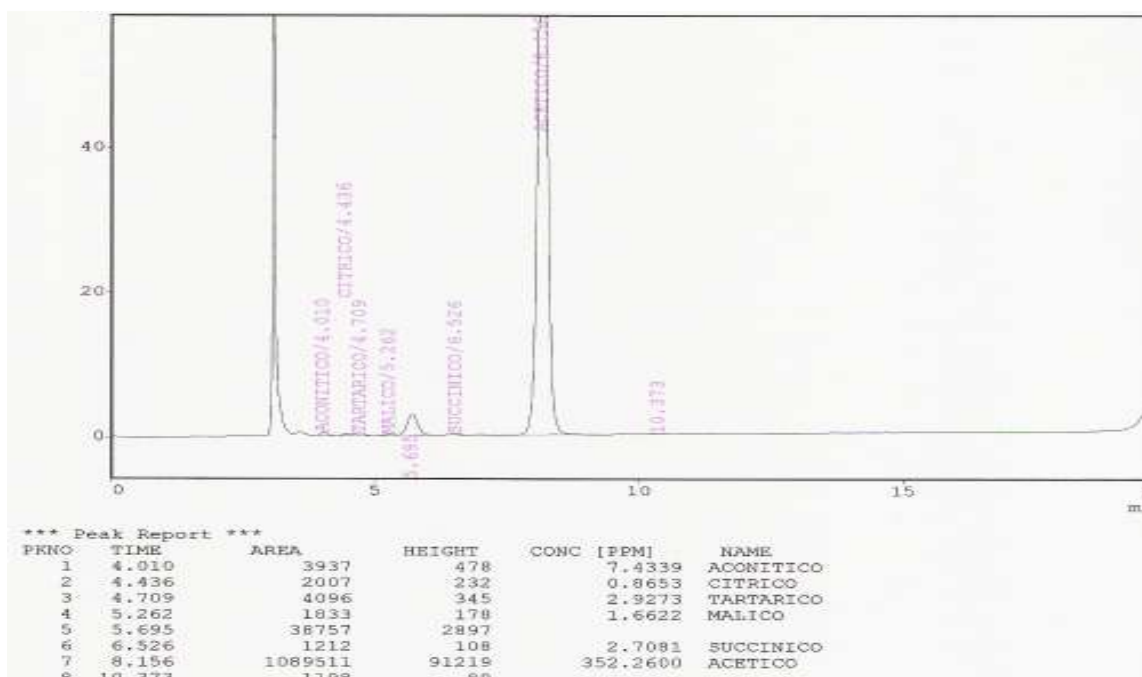


Figura A15. Quantificação cromatográfica de ácidos orgânicos do Vinagre de álcool da empresa 2.

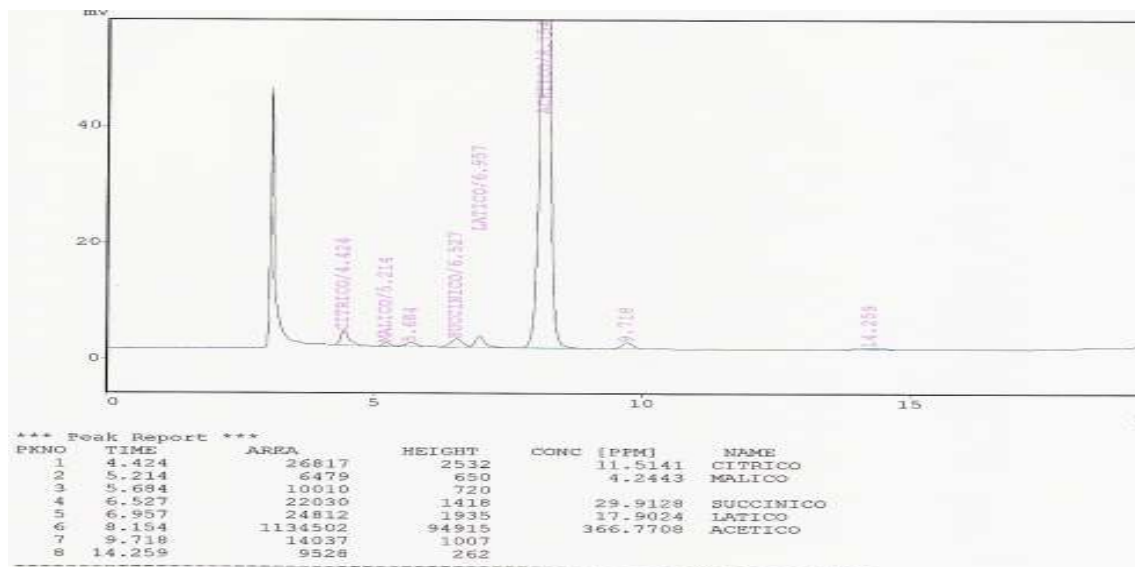


Figura A16 Quantificação cromatográfica de ácidos orgânicos do Vinagre de maçã da empresa 1.

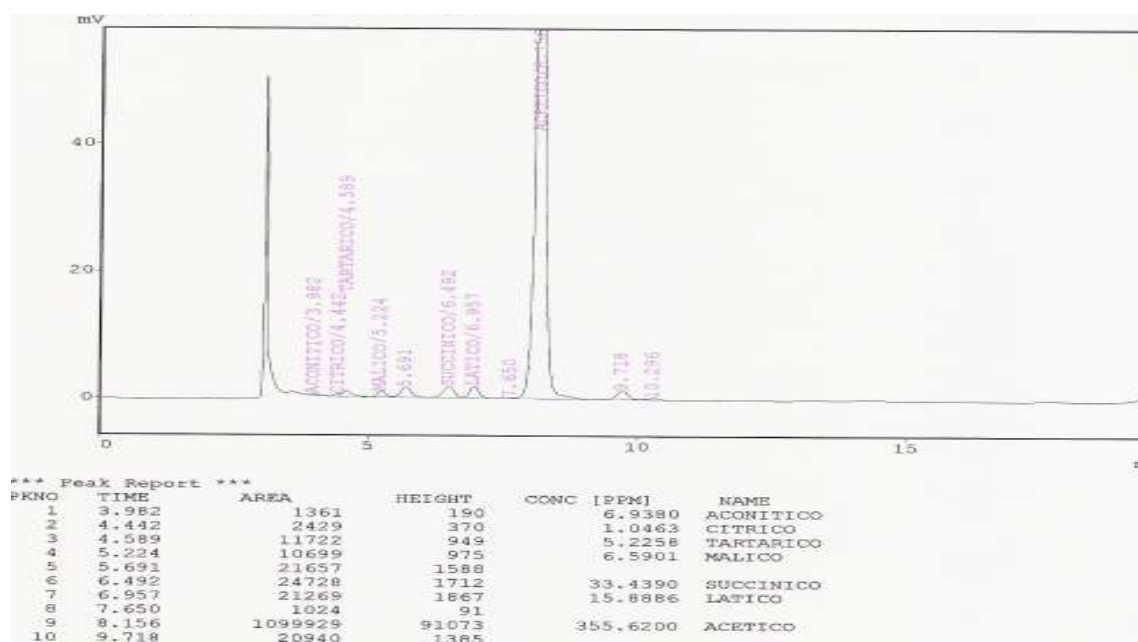


Figura A17. Quantificação cromatográfica de ácidos orgânicos do Vinagre de maçã da empresa 2.

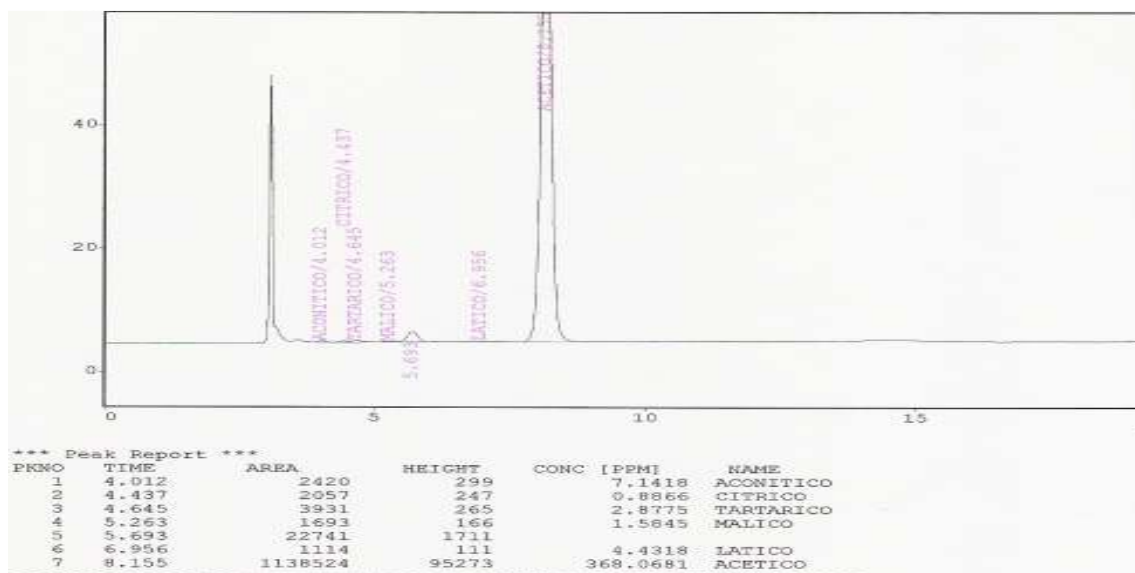


Figura A18. Quantificação cromatográfica de ácidos orgânicos do Vinagre de maçã da empresa 3.

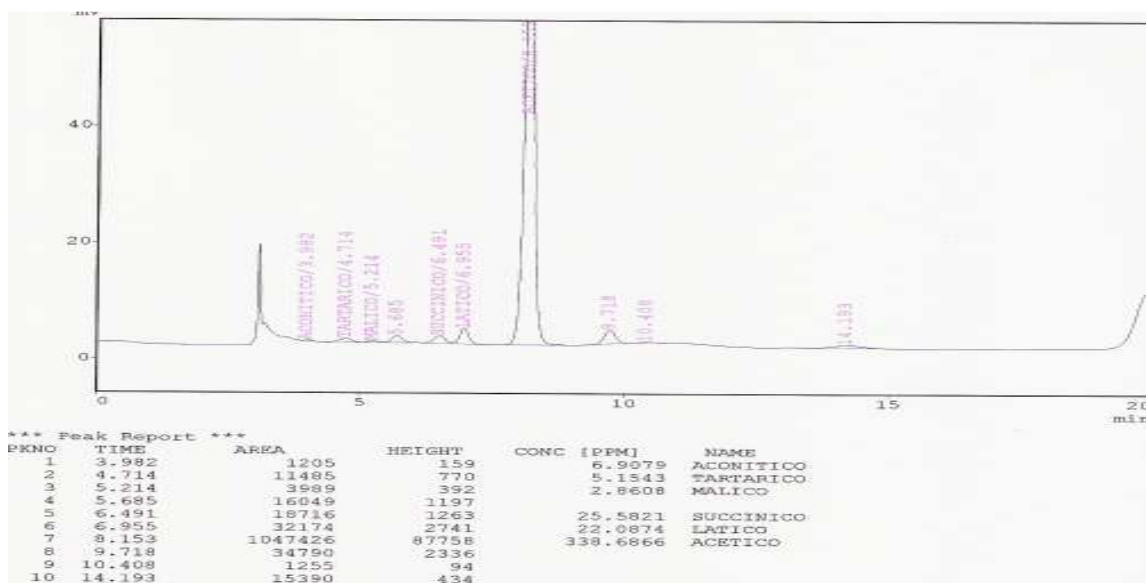


Figura A19. Quantificação cromatográfica de ácidos orgânicos do Vinagre de arroz da empresa 1.

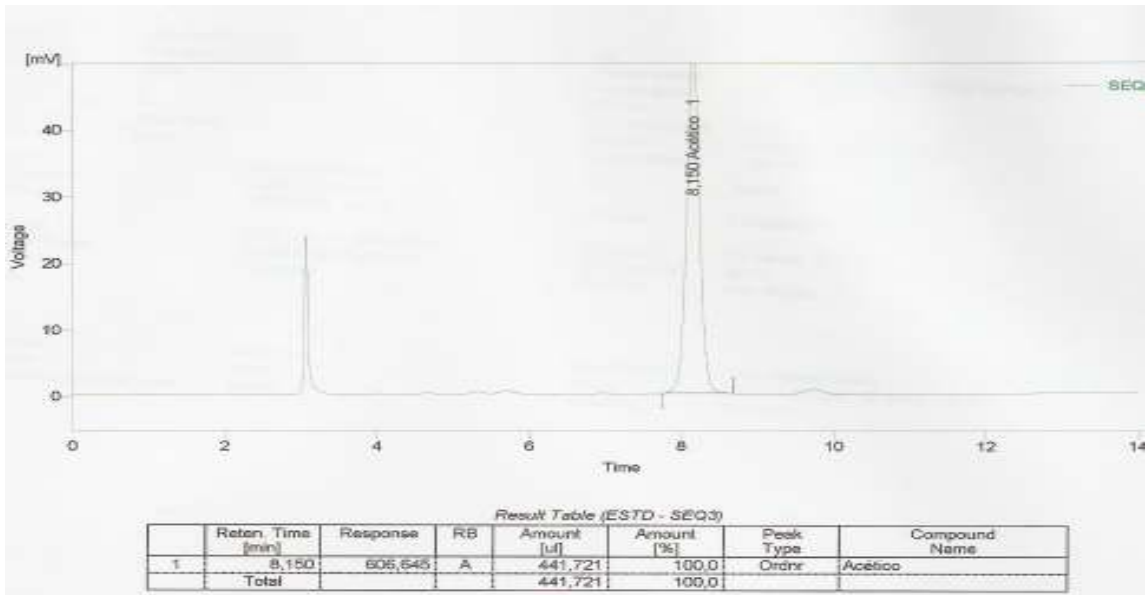


Figura A20. Quantificação cromatográfica de ácidos orgânicos do Vinagre de arroz da empresa 3.

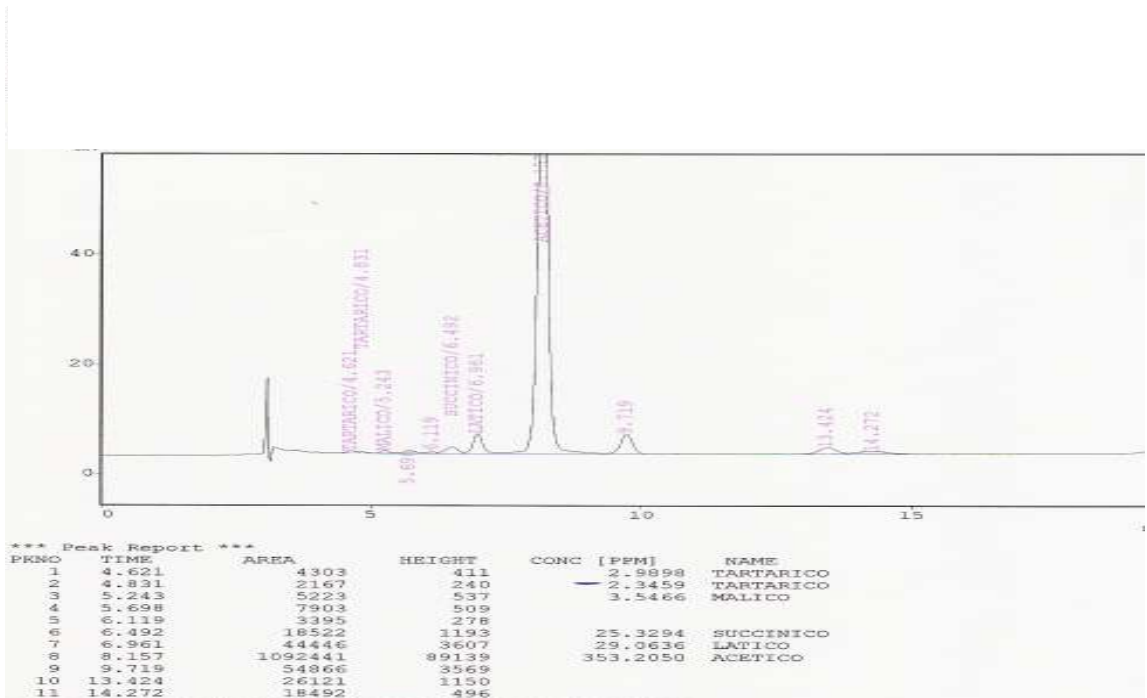


Figura A21. Quantificação cromatográfica de ácidos orgânicos do Vinagre de arroz da empresa 4.

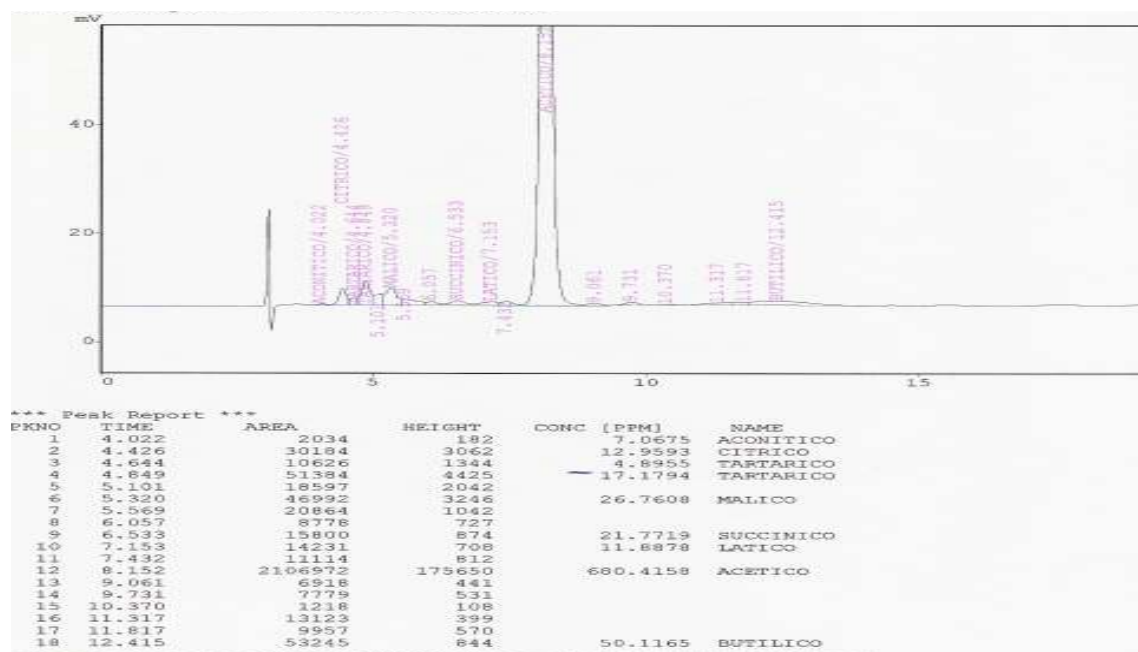


Figura A22. Quantificação cromatográfica de ácidos orgânicos do Vinagre de arroz da empresa 5.

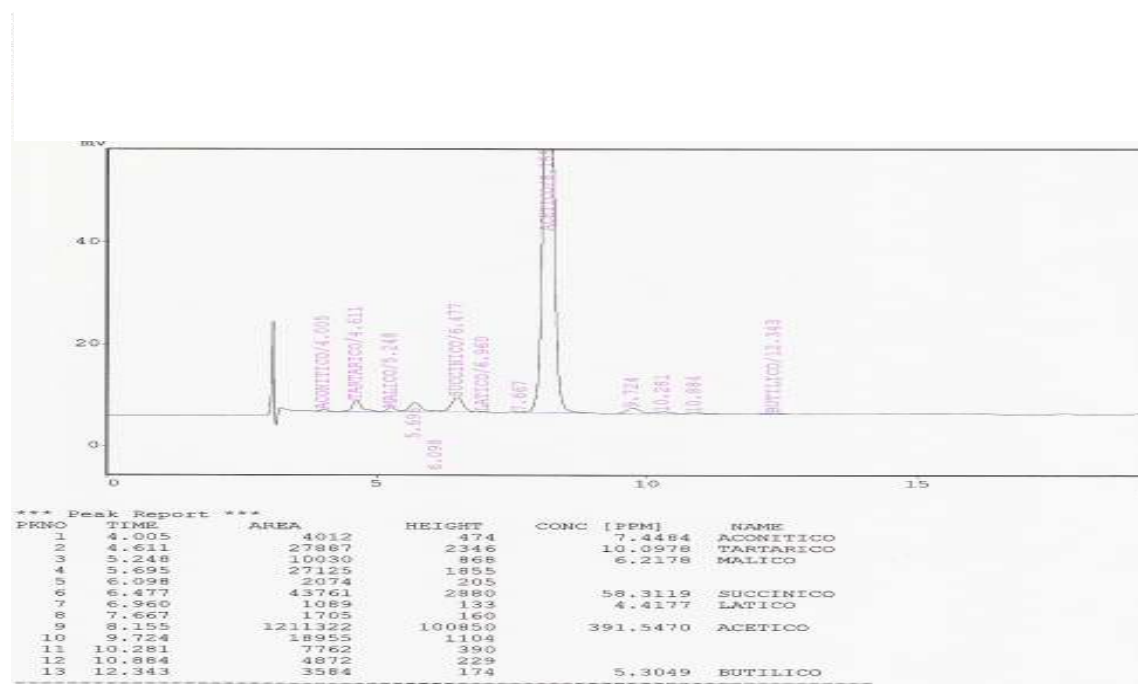


Figura A23. Quantificação cromatográfica de ácidos orgânicos do Vinagre de arroz da empresa 6.